

**Nachweis von toxinogenen Isolaten von *Stachybotrys chartarum* mit einem  
Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) – Assay**

von Johannes Michael Köck

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Nachweis von toxinogenen Isolaten von *Stachybotrys chartarum* mit einem  
Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) - Assay**

von Johannes Michael Köck  
aus Rotthalmünster

München 2022

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ-Prof. Dr. Karin Schwaiger  
Mitbetreuung durch apl. Prof. Dr. rer. nat. Ludwig Niessen, Dr. rer. nat. Dr. habil. Christoph  
Gottschalk

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Karin Schwaiger

Korreferent: Prof. Dr. Frank Ebel

Tag der Promotion: 30 Juli 2022

*Meinen Eltern*

## Abkürzungsverzeichnis

BAL	Broncho-Alveoläre-Lavage
BIP	Backward Inner Primer
Bzw.	Beziehungsweise
B3	Backward Outer Primer
<i>chs1</i>	Chitinsynthase 1 Gen
CMA	Cornmeal Agar
CY20S	Czapek Yeast Extract Sucrose 20% Agar
DG-18	Dichloran-18% Glycerin Agar
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESI	Elektrospray-Interface
FiP	Forward Inner Primer
F3	Forward Outer Primer
HeLa	Humane Zervixkarzinomzellen (HenriettaLacks)
hogA	mitogen-aktivierte Protein-Kinase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Hyd5p	Hydrophobin-Protein
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
<i>Idh</i>	Isoepoxydon Dehydrogenase Gen
ITS	Internal Transcribed Spacer
LAMP	Loop Mediated isothermal Amplification
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie
MEA	Malzextraktagar
MTT	3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-y1)2, 5-diphenyltetrazoliumbromid
OAT	Oat Meal Agar
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDA	Potato Dextrose Aagar
RM	Rice Meal Agar
<i>S.</i>	<i>Stachybotrys</i>
SBS	Sick-Building-Syndrome
SC1, 2, 3	Abschnitt 1, 2 und 3 des Satratoxin-Gencluster

---

SK	Schweine Nierenzellen
SNA	Synthetischer nährstoffarmer Agar
sp.	Spezies (Singular)
spp.	Spezies (Plural)
<i>tri5</i>	Trichodiansynthase 5 Gen
<i>tub2</i>	Beta Tubulin 2 Gen
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
z. B.	Zum Beispiel

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Zielsetzung.....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1</b>	<b>Gattung <i>Stachybotrys</i> (Ehrenb.) S. Hughes, 1958 .....</b>	<b>11</b>
2.1.1	Taxonomie .....	11
2.1.2	Morphologie von <i>S. chartarum</i> .....	12
2.1.3	Genetische Disposition der Chemotypen in <i>S. chartarum</i> .....	15
2.1.4	Mykotoxine.....	16
2.1.4.1	Trichothecene .....	18
2.1.4.2	Atranone .....	21
2.1.4.3	Phenylspirodrimane.....	23
2.1.5	Vorkommen von <i>S. chartarum</i> .....	24
2.1.5.1	Futtermittel.....	24
2.1.5.2	Lebensmittel .....	25
2.1.5.3	Innenräume und Umwelt .....	25
2.1.6	Bedeutung von <i>S. chartarum</i> als Verursacher von Intoxikationen .....	27
2.1.6.1	Mensch .....	27
2.1.6.2	Tier .....	29
<b>2.2</b>	<b>Nachweismethoden .....</b>	<b>32</b>
2.2.1	Phänotypisch .....	32
2.2.1.1	Kultur- und Mikromorphologie.....	32
2.2.2	Chemotypisch .....	33
2.2.2.1	Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie.....	33
2.2.2.2	Immunoassays .....	34
2.2.2.3	Bioassays.....	35
2.2.3	Genotypisch.....	36
2.2.3.1	PCR.....	36
2.2.3.2	Multiplex PCR.....	37
2.2.3.3	LAMP Assay.....	39
<b>3</b>	<b>Publikation .....</b>	<b>44</b>



---

<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>79</b>
4.1	Vergleich LAMP und PCR.....	80
4.2	Zukünftige Anwendbarkeit in der Diagnostik.....	81
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>83</b>
<b>6</b>	<b>Summary .....</b>	<b>84</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>85</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>101</b>
<b>9</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>102</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>103</b>

## 1 Einleitung und Zielsetzung

*Stachybotrys chartarum* (*S. chartarum*) ist ein saprobiotischer, ubiquitär vorkommender Schimmelpilz, der in der Lage ist, hochtoxische Mykotoxine zu bilden. *S. chartarum* wächst bevorzugt auf cellulosereichen Substraten wie Stroh, Rigipsplatten und Tapeten nach Feuchteschäden in Innenräumen (Nielsen et al., 1998).

Das Krankheitsbild der Stachybotryotoxikose wurde in der englischsprachigen Literatur erstmals von Forgacs (1972) zusammengefasst. Als Auslöser gelten die zytotoxischen makrozyklischen Trichothecene. Eine Gesundheitsgefährdung des Menschen besteht bei Umgang mit befallenen Futter und Einstreumaterial, sowie durch Exposition in Innenräumen (Hintikka, 1978; Johanning, 1994).

Die makrozyklischen Trichothecene werden nur von *S. chartarum* Chemotyp S gebildet, während andere Chemotypen der gleichen Art dazu nicht befähigt sind (Andersen et al., 2003). Der Chemotyp A produziert einfache Trichothecene und Atranone (Andersen et al., 2002). Ulrich et al. (2019) schlugen anhand der Detektion von Atranon- und Satratoxin-Genclustern aus der Arbeit von Semeiks et al. (2014) eine weitere Unterteilung der Art in drei verschiedene Genotypen vor, wobei nur Isolate der als Genotyp S bezeichneten Kategorie den Chemotyp S repräsentieren.

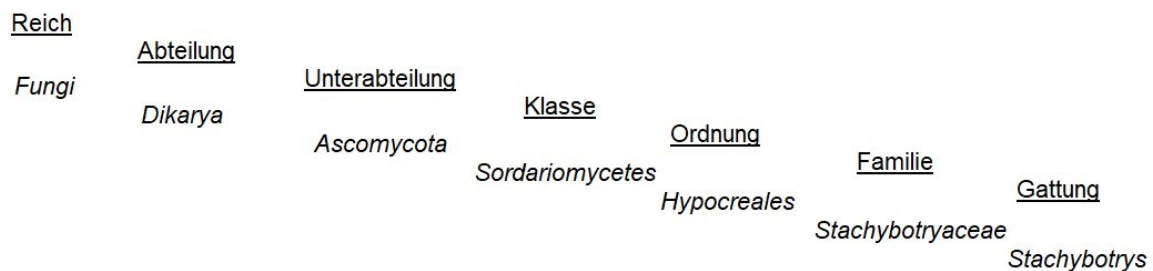
Ziel dieser Arbeit war es, eine Nachweismethode zu entwickeln und zu optimieren, mit der der hochtoxische Genotyp von *S. chartarum* spezifisch und mit einfachen Mitteln nachgewiesen werden kann. Bei dem hier eingesetzten Verfahren der loop-mediated isothermal amplification (LAMP) wird ein spezifischer Genlocus unter isothermalen Bedingungen amplifiziert. Der Nachweis des Amplifikats und somit der positiven Reaktion wird durch einen Indikator-basierten Farbumschlag im Reaktionsgefäß angezeigt und kann mit bloßem Auge abgelesen werden.

## 2 Literatur

### 2.1 Gattung *Stachybotrys* (Ehrenb.) S. Hughes, 1958

#### 2.1.1 Taxonomie

Die aktuelle Systematik der Gattung *Stachybotrys* ist in Abbildung 1 dargestellt.



**Abbildung 1:** Aktuelle Systematik der Gattung *Stachybotrys* (Encyclopedia of Life, 2021)

Es sind sieben Synonyme für die Gattung *Stachybotrys* beschrieben (Seifert et al., 2011): *Fuckelina* Sacc.(1875), *Gliobotrys* Höhn. (1902), *Hyalobotrys* Pidopl. (1948), *Spinomyces* Saito (1939), nom. inval. Art. 36 (nomen invalidum) (= *Memnoniella*), *Synsporium* Preuss (1849) und *Hyalostachybotrys* (1958)

Der Botaniker Corda isolierte als erster den Pilz *Stachybotrys* von einer befallenen Tapete und beschrieb diesen als *S. atra* CORDA (Corda, 1837).

Heute führt *Encyclopedia of Life* (2021) 87 beschriebene Arten in der Gattung *Stachybotrys* auf. Darunter sind Produzenten von hochtoxischen makrozyklischen Trichothecenen (*S. chartarum* Chemotyp S, *S. dichroa*), einfachen Trichothecenen (*S. nephrospora*, *S. oenantes*), Atranonen (*S. chartarum* Chemotyp A, *S. chlorohalonata*, *S. microspora*) und Phenylspirodri-manen (Andersen et al., 2002; Andersen et al., 2003; Jarvis et al., 1995).

Früher wurde die Einteilung zur Gattung *Stachybotrys* rein morphologisch vorgenommen (Bisby, 1943).

Eine exaktere Ordnung und Abgrenzung der Arten konnte erst unter Zuhilfenahme von modernen Methoden der DNA-Analyse erreicht werden (Wang et al., 2015b). Mithilfe von DNA-

Analysen (Haugland et al., 2001) und Untersuchungen des Metabolitenprofils (Wang et al., 2015a; Wang et al., 2015b) wurde *Memnoniella* zunächst der Gattung *Stachybotrys* zugeordnet, inzwischen aber als eigene Gattung bestätigt (Lombard et al., 2016; Samson et al., 2019).

Aufgrund der Mykotoxinproduktion (Andersen et al., 2002; Andersen et al., 2003; Ulrich et al., 2019) wurde die Spezies *S. chartarum* in einen makrozyklische Trichothecene produzierenden Chemotyp S und einen Atranon bildenden Chemotyp A unterteilt.

Inzwischen lassen sich bei *S. chartarum* anhand der für die Toxine verantwortlichen Genclustern drei verschiedene Genotypen unterschieden (Semeiks et al., 2014). Der Genotyp S besitzt alle nötigen Gene für die Satratoxin Produktion, der Genotyp A vereint die Gene für die Synthese von Atranonen. Der Genotyp H hingegen wird als Hybridtyp bezeichnet, da er alle Atranon-Gene aber einen unvollständigen Satz der Satratoxin-Gene aufweist (Ulrich et al., 2019).

### **2.1.2 Morphologie von *S. chartarum***

Zur Anzucht von *Stachybotrys* werden Potato Dextrose Agar (PDA) und Synthetischer Nährstoffarmer Agar (SNA) als Festnährmedien empfohlen (Samson et al., 2019). Feste Anzuchtmedien im Hinblick auf Kultivierung von *Stachybotrys* werden in Tabelle 1 dargestellt. Nach Frazer et al. (Frazer et al., 2011) liegt die Temperatur für optimales Wachstum von *S. chartarum* zwischen 25 °C und 30 °C. Der optimale Gehalt an freiem Wasser liegt bei  $a_w = 0,997$ . Für die Sporulation hingegen erwiesen sich 30 °C bei gleichbleibender Wasseraktivität als hervorragende Parameter. Tages- und UV-Licht hemmen die Sporenbildung des Pilzes, deshalb erfolgt die Bebrütung im Dunkeln (Samson et al., 2019).

**Tabelle 1:** Wachstum und Versporung von *Stachybotrys* auf verschiedenen Festnährmedien nach Andersen und Nissen (2000)

Nährboden	Wachstum	Sporulation	Mittlerer Koloniedurchmesser nach 7 Tagen
<b>AFPA</b> ( <i>Aspergillus flavus</i> und <i>parasiticus</i> Agar)	+ <sup>1</sup>	- <sup>2</sup>	n. b. <sup>3</sup>
<b>CREA</b> (Creatine Sucrose Agar)	+/- <sup>4</sup>	-	n. b.
<b>CYA</b> (Czapek Yeast Extract Agar)	+	-	23 mm <sup>5</sup>
<b>CY20S</b> (Czapek Yeast Extract Sucrose 20% Agar)	+	+	n. b.
<b>DG18</b> (Dichloran 18% Glycerol Agar)	+/-	-	3 mm - 7mm <sup>6</sup>
<b>DRBC</b> (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar)	+	-	n. b.
<b>DRYES</b> (Dichloran Rose Bengal Yeast Extract Sucrose Agar)	+	-	n. b.
<b>OAT</b> (Oat Meal Agar)	+	+	n. b.
<b>PSA</b> (Potato Sucrose Agar)	+	-	n. b.
<b>PDA</b> <sup>7</sup> (Potatoe Dextrose Agar)	+	+	28 mm <sup>6</sup>
<b>SNA</b> (Synthetischer Nährstoffarmer Agar)	+/-	-	12 mm – 30 mm <sup>6</sup>
<b>CMA</b> (Cornmeal Agar)	+	+	n. b.
<b>MEA</b> (Malzextrakt Agar)	+	-	18 mm – 22mm <sup>6</sup>
<b>RM</b> (Rice Meal Agar)	+	+	n. b.
<b>V8</b> (V8 Juice Agar)	+	-	n. b.

<sup>1</sup> + = Alle 9 getesteten *Stachybotrys*-Isolate zeigten Wachstum

<sup>2</sup> - = Keines der 9 getesteten *Stachybotrys*-Isolate zeigte Wachstum

<sup>3</sup> n. b. = nicht bekannt

<sup>4</sup> +/- = Zwischen 1 und 6 Stämmen der 9 getesteten *Stachybotrys*-Isolate zeigten kein Wachstum

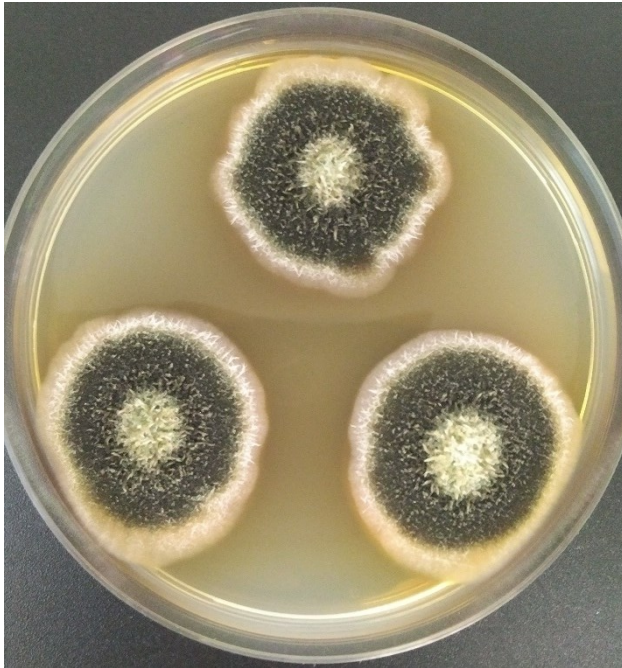
<sup>5</sup> nach Andersen et al. (2003)

<sup>6</sup> nach Samson et al. (2019)

<sup>7</sup> nach Frazer et al. (2011)

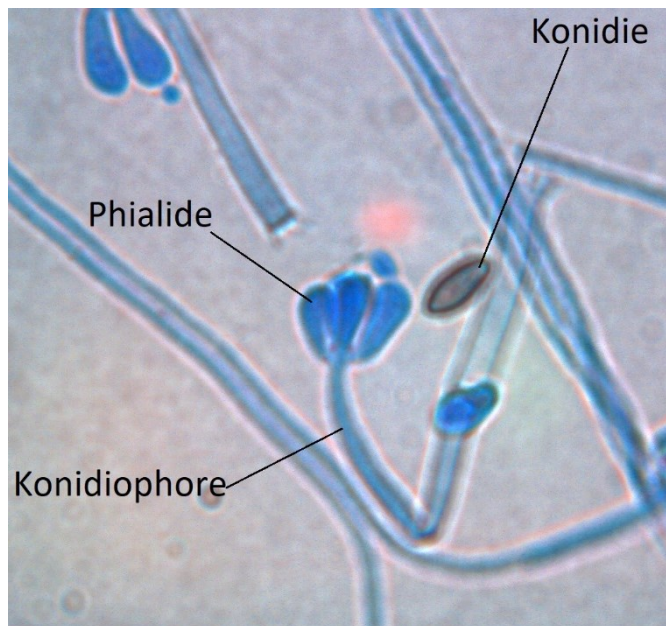
Ausgehend von einer siebentägigen Kultivierung bei 25 °C erreichen Kolonien auf PDA einen Durchmesser von 28 mm, sind schwarzgrün mit weißem Rand und erscheinen pudrig. Bei manchen Isolaten entstehen orange-braune extrazelluläre Pigmente (Samson et al., 2019). Auf SNA ist nach siebentägiger, lichtgeschützter Kultivierung bei 25 °C ein Durchmesser von 30 mm erreicht. Das fadenförmige Myzel besitzt auf diesem Medium ein schwarzgrünes Zentrum (Samson et al., 2019). Auf Malzextraktagar (MEA) erscheint *S. chartarum* grau bis schwarz. Es findet sich wie auch bei PDA gelegentlich ein orange-braunes extrazelluläres Pigment

(Andersen et al., 2003). Die Kolonien haben auf diesem Medium nach siebentägiger Kultivierung einen Durchmesser von 22 mm und bilden federartige Synnemata (Samson et al., 2019).



**Abbildung 2:** *S. chartarum* auf MEA – Dreipunktkultur (eigene Aufnahme)

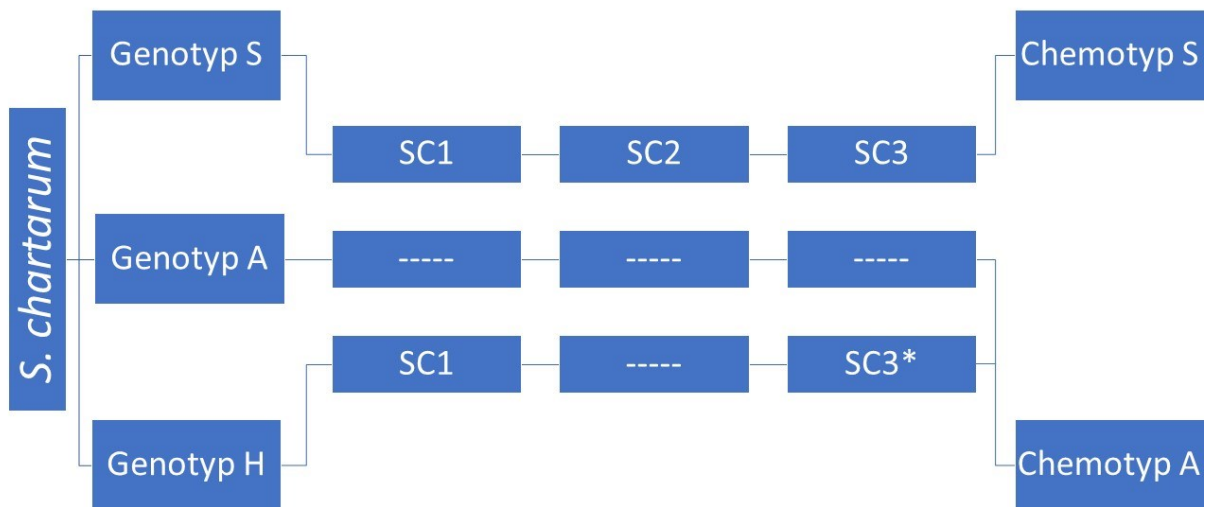
Die Konidiophoren von *S. chartarum* sind einfach oder (seltener) verzweigt und erlangen bis zu 100  $\mu\text{m}$  in der Länge und 3  $\mu\text{m}$  bis 6  $\mu\text{m}$  in der Breite auf SNA. *S. chlorohalonata* dagegen erreicht bei den Konidiophoren Größen von 40  $\mu\text{m}$  -70  $\mu\text{m}$  in der Länge und 3  $\mu\text{m}$  – 6  $\mu\text{m}$  in der Breite. Sie sind glatt an der Basis und rau und dunkel an der Spitze. Die Phialiden, die in Haufen von 4 bis 10 auf jedem Konidiophor gebildet werden sind glatt, obovoid und hyalin an der Basis und zeigen zur Spitze hin. Auf Cornmeal Agar (CMA) erreichen sie eine Maximalgröße von 13  $\mu\text{m}$  x 6  $\mu\text{m}$  (Andersen et al., 2003), bei *S. chlorohalonata* hingegen nur 11  $\mu\text{m}$  x 6  $\mu\text{m}$ . Die Konidien werden oft von ellipsoiden und hyalinen Schleimköpfen umgeben und messen maximal 12  $\mu\text{m}$  x 6  $\mu\text{m}$  (*S. chlorohalonata* 11  $\mu\text{m}$  x 6  $\mu\text{m}$ ) auf CMA (Andersen et al., 2003). Reife Konidien sind nicht septiert, ellipsoidal, grob aufgeraut und schwarz (Samson et al., 2019). Die Konidien von *S. chlorohalonata* hingegen stellen sich glatt, ellipsoidal bis breit ellipsoidal dar (Andersen et al., 2003).



**Abbildung 3:** Konidiophore mit Phialiden und einer einzelnen Konidie von *S. chartarum*, Laktophenolblau, 400-fache Vergrößerung (eigene Aufnahme)

### 2.1.3 Genetische Disposition der Chemotypen in *S. chartarum*

Die Spezies *S. chartarum* wird in die Genotypen S, A und H eingeteilt. Die unterschiedliche genetische Ausstattung der drei Typen führt zur Ausbildung eines von zwei Chemotypen (Andersen et al., 2003; Ulrich et al., 2019). Das Set der Gene bestimmt folglich die Fähigkeit zur Synthese von Metaboliten, die spezifisch für den jeweiligen Chemotyp sind. Die Genotypen A und H werden dem Atranon-produzierenden Chemotyp A, der Genotyp S hingegen wird dem Chemotyp S zugeordnet. Dieser ist in der Lage, die hochtoxischen makrozyklischen Trichothecene wie Satratoxin G und H zu produzieren (Andersen et al., 2002; Jarvis et al., 1983) (siehe 2.1.4). An der Synthese von makrozyklischen Trichothecenen sind spezifische Gencluster beteiligt. Die Gene *SAT1* – *SAT21* wurden von Semeiks et. al (2014) in drei *SAT* Cluster eingeteilt (SC1 - SC3). Alle 21 *SAT* Gene konnten in der Arbeit von Ulrich et. al (2019) nur im Genotyp S nachgewiesen werden, der Genotyp A hingegen wies keines der *SAT* Gene auf. In der Studie konnten sowohl alle Gene des SC1 (*SAT1* – *SAT10*) in Genotyp H nachgewiesen werden als auch vier von fünf Genen des SC3 (*SAT17* – *SAT 21*). *SAT21* war nur in zwei der fünf getesteten H-Typen präsent. Bei Genotyp A und H konnten die Gene des SC2 (*SAT11* – *SAT16*) nicht nachgewiesen werden (Ulrich et al., 2019).



**Abbildung 4:** Darstellung der unterschiedlichen genetischen Ausstattung von *S. chartarum*

(Genotypen) und die daraus resultierenden Chemotypen; ----- = keines der Gene des entsprechenden Cluster konnte nachgewiesen werden. \* = Bei zwei von vier der getesteten *S. chartarum* Genotyp H konnte *SAT 21* nachgewiesen werden.

Die Gene des SC2 wurden in der vorliegenden Arbeit als genetischer Marker für die hochgradig zytotoxischen Stämme unter *S. chartarum* genutzt, da nur der Chemotyp S diese aufweist.

#### 2.1.4 Mykotoxine

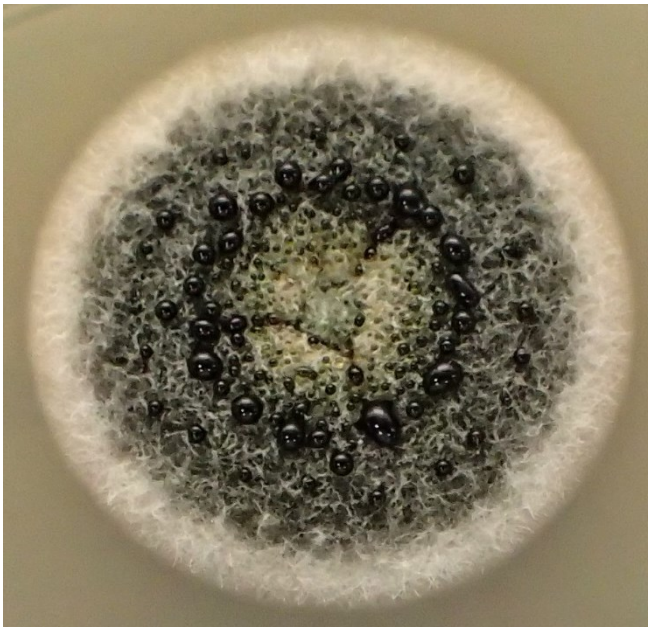
Metabolite des sekundären Stoffwechsels sind Produkte, die scheinbar nicht zur Lebenserhaltung der sie bildenden Organismen nötig sind. Folglich können auch Pilze ohne die Produktion solcher Sekundärmetabolite wachsen (Bennett und Bentley, 1989; Gräfe, 1993). Sie wurden in der Literatur oft als „Abfall – und Detoxifikationsprodukte“ bezeichnet (Haslam, 1986).

Der Begriff Sekundärmetabolite für Mykotoxine ist zu ungenau. Sie werden nun als Extrolite bezeichnet, da sie für die Interaktion des bildenden Organismus mit der Umwelt Funktionen wahrnehmen, wozu sie in die Umgebung abgesondert und/oder an der Zellwand angereichert werden können (Samson und Frisvad, 2004).

Bei einigen Arten findet man sie auch hochkonzentriert in den als Guttationströpfchen bezeichneten wässrigen Ausscheidungen, die sich auf der Oberfläche von Pilzkulturen und an deren Hyphen finden (Gareis und Gottschalk, 2014). Im Falle von *S. chartarum* treten



Mykotoxine sowohl in den Guttationstropfen, Konidiosporen und Pilzmycel sowie im umgebenden Nährsubstrat auf. Ein möglicher Grund für die aktive Exkretion von toxischen Extroliten ist die Habitatskonkurrenz zwischen Mikromyzeten untereinander und anderen Konkurrenten wie z. B. Bakterien (Gareis und Gottschalk, 2014).



**Abbildung 5:** Guttationströpfchen auf einer Kultur von *S. chartarum* auf MEA  
(eigene Aufnahme)

Die Extrolite von *Stachybotrys* spp. gliedern sich in die drei übergeordneten Gruppen der Atranoone, Trichothecene und Phenylspirodrimane. Die beiden Spezies *S. chartarum* und *S. chloralonata* synthetisieren zusammen Mykotoxine aller drei Gruppen (Andersen et al., 2003) (siehe Tabelle 2).

**Tabelle 2:** Metabolitenprofil von *S. chartarum* und *S. chlorohalonata*

(Andersen et al., 2002; Andersen et al., 2003; Jarvis et al., 1995; Jarvis et al., 1998)

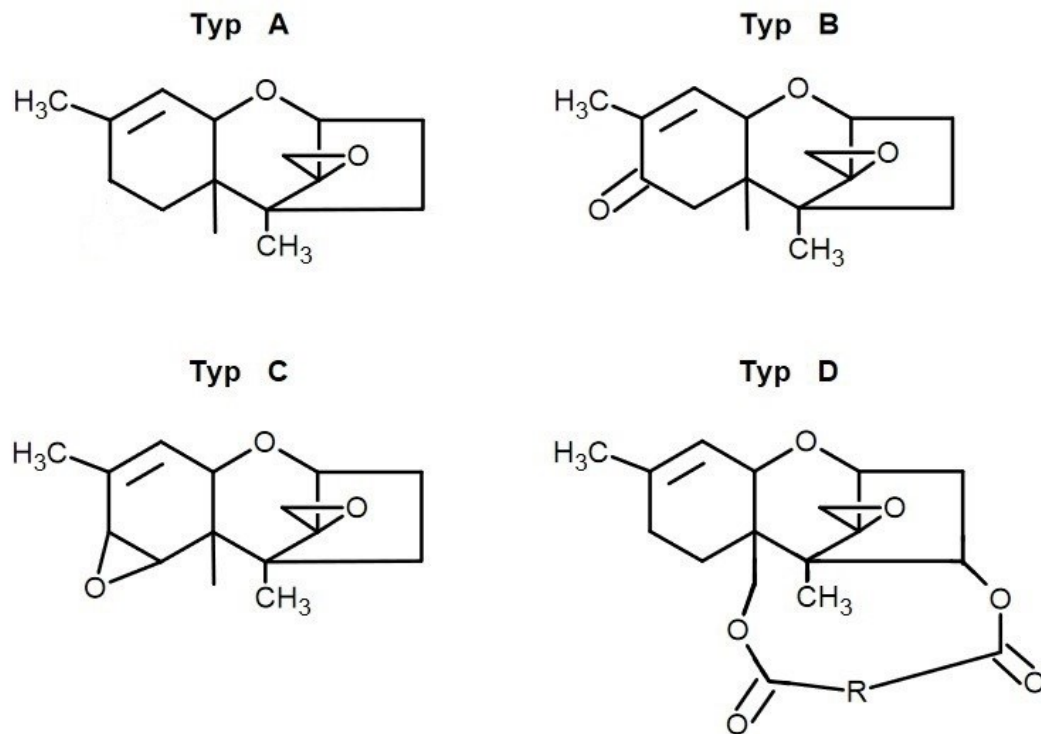
<i>Stachybotrys</i> Spezies	<i>Makrozyklische</i> Trichothecene	<i>Einfache</i> Trichothecene	Atranone	Pheylspirodrimane
chartarum	+ <sup>1</sup>	+	- <sup>2</sup>	+
<b>Chemotyp S</b> chartarum	-	+	+	+
<b>Chemotyp A</b> chartarum	-	n. b. <sup>4</sup>	n. b.	n. b.
<b>Genotyp H<sup>3</sup></b> chlorohalonata	-	+	+	+

<sup>1</sup> Wird gebildet<sup>2</sup> Wird nicht gebildet<sup>3</sup> nach Ulrich et al. (2019)<sup>4</sup> Nicht bekannt

#### 2.1.4.1 Trichothecene

Trichothecene umfassen eine Gruppe von über 150 Metaboliten die von verschiedenen Pilzgattungen synthetisiert werden (Cope, 2018; Gutleb et al., 2002), darunter die Gattungen *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Myrothecium*, *Spicellum*, *Stachybotrys*, *Trichoderma* und *Trichothecium* (Cole et al., 2003; McCormick et al., 2011).

Trichothecene sind zyklische Sesquiterpene, die nach ihrer chemischen Struktur in vier unterschiedliche Typen eingeteilt wurden (Typ A-D) (Ueno, 1983).



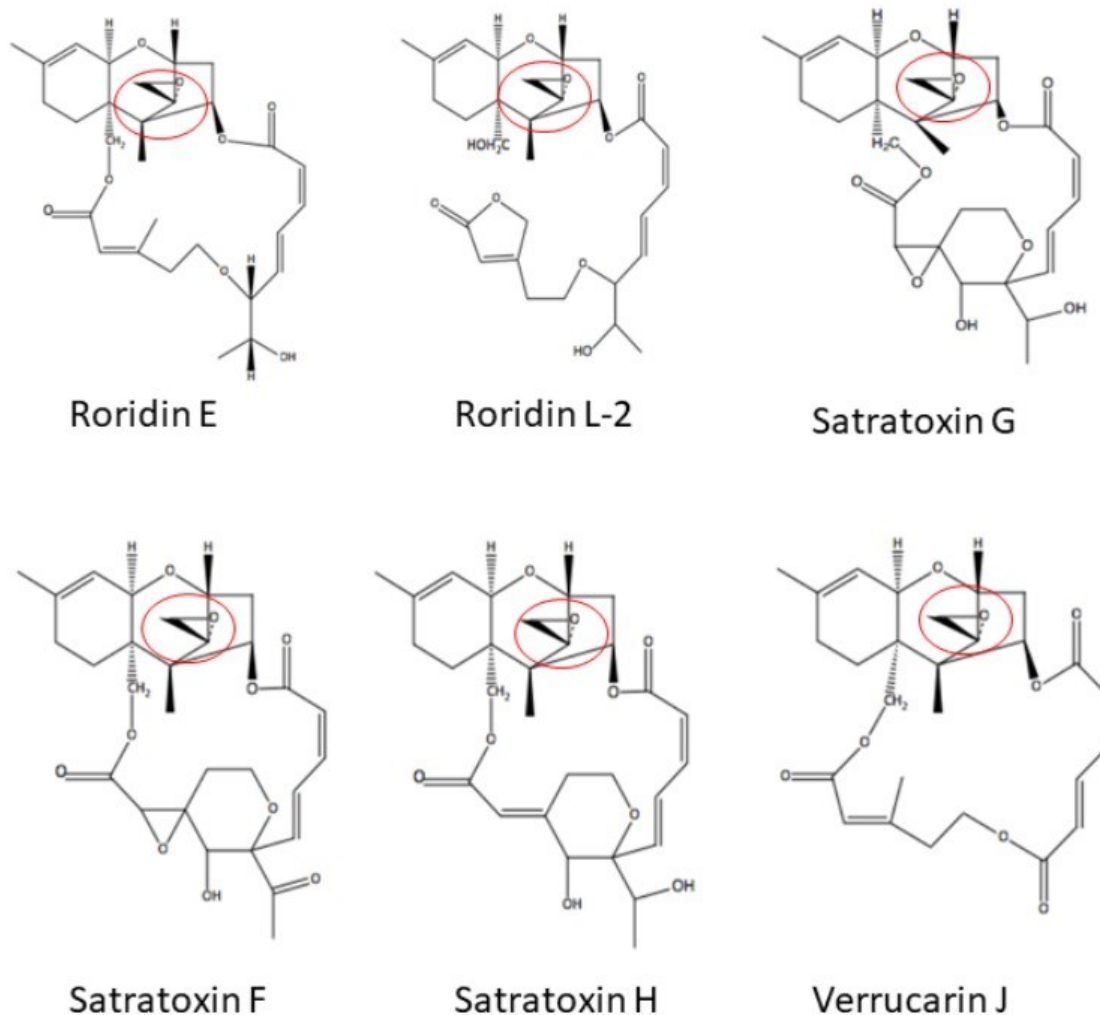
**Abbildung 6:** Chemische Kernstruktur für die Trichothecene A-D nach Shank et al. (2011),  
(Cole et al., 2003; Ueno, 1983)

Typ A und B Trichothecene unterscheiden sich chemisch an der Position C-8 und werden vorwiegend von der Gattung *Fusarium* synthetisiert (Ueno, 1983). Auch Typ C Trichothecene können anhand der chemischen Gruppe am Kohlenstoff der Position 8 von den anderen Typen unterschieden werden. Sie können in einfacher oder in makrozyklischer Form vorliegen und werden vorwiegend von den Gattungen *Cephalosporium* und *Trichothecium* gebildet (Cole et al., 2003).

Typ D Trichothecene sind makrozyklische Trichothecene, die sich chemisch von den anderen Typen durch einen zusätzlichen Ring, der die C-4 mit der C-15 Position verbindet, abgrenzen (McCormick et al., 2011). Isolate von *S. chartarum*, die dem Chemotyp S zugerechnet werden, sind in der Lage, die makrozyklischen Trichothecene Satratoxin F, G, H, Verrucaridin J sowie Roridin E und L-2 zu produzieren (Andersen et al., 2002; Jarvis et al., 1988).

Außer den genannten Pilzen sind noch die beiden Pflanzenarten *Baccharis megapothamica* (Jarvis et al., 1987) und *Holarrhena floribunda* (Loukaci et al., 2000) in der Lage, Typ D Trichothecene als Phytotoxine zu bilden. Man vermutet, dass die Synthesefähigkeit der Pflanze

auf einen Transfer der nötigen Gene von *Myrothecium* zurückgeht, da es sich um dieselben makrozyklischen Trichothecene handelt wie bei dem Pilz (Jarvis et al., 1988). Eine andere Theorie geht von einer Synthese der Gifte durch endophytisch lebende Pilze aus (Liu et al., 2016).



**Abbildung 7:** Strukturformeln der makrozyklischen Trichothecene, die von *S. chartarum* Chemotyp S gebildet werden können; Ohne Isoformen (Ekruth, 2021) nach Cole et al. (2003)

Die Typ D Trichothecene binden irreversibel an die 60S Untereinheit der Ribosomen und unterbinden somit die Proteinbiosynthese der Zelle. Dadurch besitzen sie die höchste Toxizität im Vergleich zu den einfachen Trichothecenen (Feinberg et al., 1989; Ueno, 1977). Aufgrund ihrer membranpermeablen Eigenschaften werden Trichothecene schnell über die äußere Haut und über den Magen-Darmtrakt aufgenommen (Middlebrook und Leatherman, 1989)

und entfalten ihre toxische Wirkung auf mitotisch aktive Zellen (Wannemacher und Wiener, 1997). Eine Intoxikation äußert sich in Symptomen wie Vomitus, hämorrhagischen Läsionen, Hautirritationen sowie immunologischen Problemen (Pestka, 2008; Ueno und Hsieh, 1985).

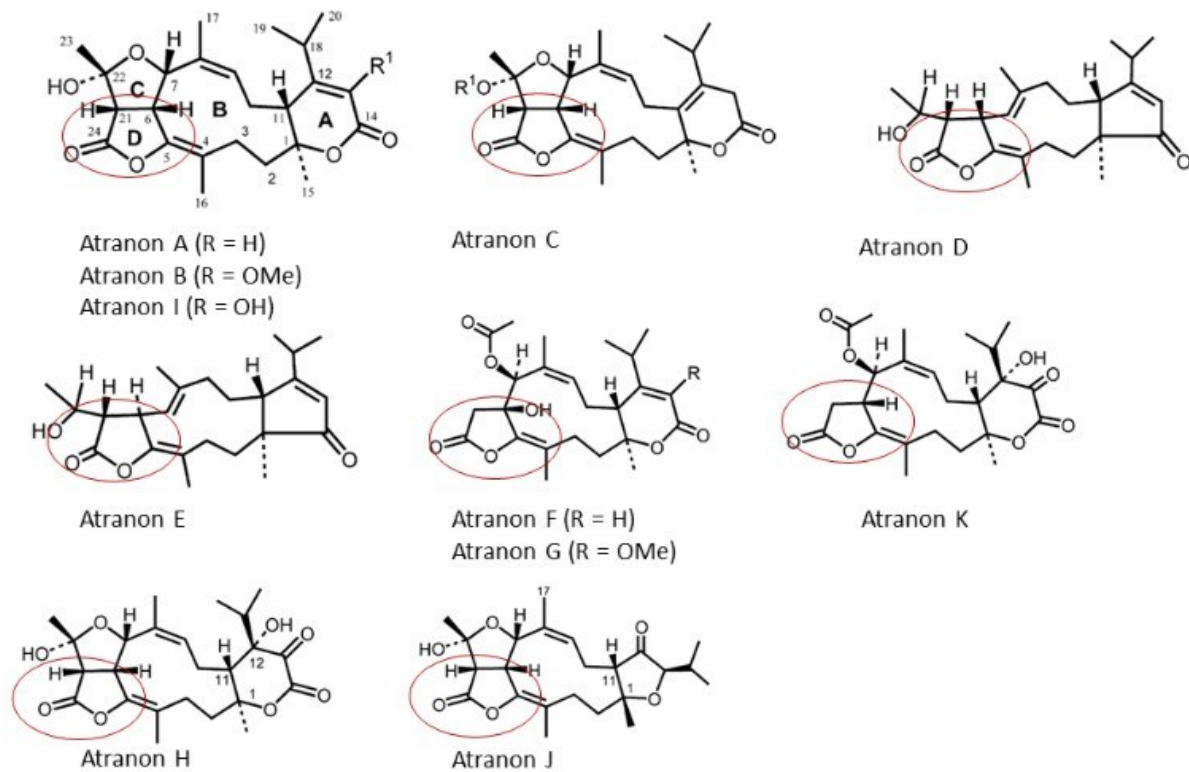
Makrozyklische Trichothecene haben neben den zytotoxischen Eigenschaften auch immunomodulatorische und immunsuppressive Effekte. Die Ausprägung dieser Effekte ist dabei von der Dauer der Exposition und von der Dosis des Giftes abhängig (Genevieve S. Bondy, 2000).

Im Zytotoxizitätstest an SK-Zellen (Schweine-Nierenzellen) zeichnen sich makrozyklische Trichothecene mit  $IC_{50}$ -Werten von  $<0,1 \mu\text{g/ml}$  (Inhibitorische Konzentration, die 50% des Zellwachstums hemmt) als hochgradig zytotoxisch aus. Im Gegensatz dazu weisen die ebenfalls stark zellschädigenden Typ B Trichothecene wie Nivalenol und Deoxynivalenol, die von Fusarien gebildet werden, lediglich  $IC_{50}$ -Werte von  $<20 \mu\text{g/ml}$  auf (Hanelt et al., 1994).

#### **2.1.4.2 Atranone**

Die chemisch zu den Dollabellan-Diterpenen zählenden Atranone werden von *S. chartarum* Stämmen des Chemotyp A und von *S. chlorohalonata* gebildet und umfassen die Typen A – K (Hinkley et al., 1999; Hinkley et al., 2000; Hinkley et al., 2003) (vgl. Abbildung 8). Wie in Tabelle 2 gezeigt, können Stämme vom Chemotyp A und *S. chlorohalonata* keine makrozyklischen Trichothecene bilden. In der Regel synthetisieren sie jedoch zusätzlich zu Atranonen und Phenylspirodrimanen auch einfache Trichothecene (Andersen et al., 2003).

Der Genotyp H besitzt laut Triplex-PCR die für die Atranonbildung nötigen Gene, doch sein Metabolitenprofil wurde bisher für diese Mykotoxine nicht veröffentlicht (Ulrich et al., 2019).



**Abbildung 8:** Strukturformeln der Atranone A – K, Ekruth (2021) nach Jarvis et al. (2003), Rot: eingekreistes Enol-Lacton-System

Bei kürzlich identifizierten Atranonen aus *S. chartarum* konnten antimikrobielle Effekte auf die Bakterien *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecalis* und Methicillin resistente *Staphylococcus aureus* sowie auf den Hefepilz *Candida albicans* nachgewiesen werden (Yang et al., 2019).

Rand et al. (2006) beobachteten eine starke Erhöhung der Konzentration von proinflammatorischen Zytokinen, sowie einen signifikanten Anstieg der Anzahl von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in der Broncho-Alveolären-Lavage Flüssigkeit (BAL) von Mäusen nach vorheriger intratrachealer Instillation von Atranon A und C (siehe Abbildung 8). Aufgrund der Daten des Mausmodells kann von einer proinflammatorischen Wirkung auf Säugetiere und somit auch auf den Menschen ausgegangen werden, jedoch sind die zytotoxischen Eigenschaften der Atranone deutlich geringer ausgeprägt als bei den makrozyklischen Trichothecenen in Säugetierzellen (Abbas et al., 2002).

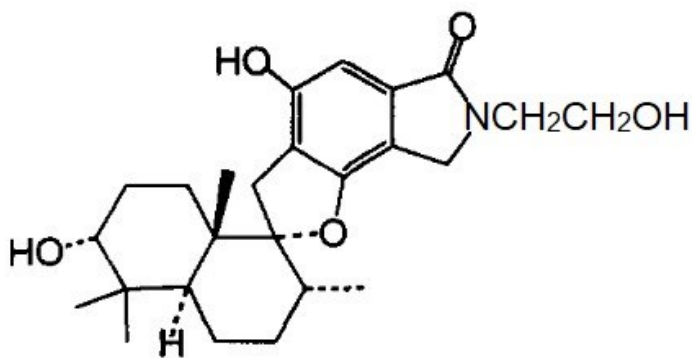
Li et al. (2017) beschrieben für ein Atraron von *S. chartarum* die Eigenschaft in vitro adulte Spinalganglien aus Mäusen im Wachstum signifikant zu begünstigen, ohne das Zellüberleben negativ zu beeinflussen.

Des Weiteren wurden bereits antitumoröse Eigenschaften von Atraronen gegen humane Osteosarkomzellen beschrieben (Qin et al., 2020).

### 2.1.4.3 Phenylspirodrimane

Phenylspirodrimane gehören zur Klasse der Meroterpenoide. Bisher konnten über 120 verschiedene Verbindungen dieser Stoffklasse aus *Stachybotrys* und *Memnoniella* isoliert werden und es werden kontinuierlich neue Dimere der Phenylspirodrimane beschrieben (Chunyu et al., 2016; Kim et al., 2016; Wang et al., 2015a; Zhang et al., 2017; Zhao et al., 2017a; Zhao et al., 2017b). Diese strukturelle Diversität beruht vor allem auf unterschiedlichen Verbindungsmustern zweier Phenylgruppen (Liu et al., 2020).

Phenylspirodrimane, wie das Stachybotryamid (Abbildung 9), gelten als immunosuppressiv sowie als Protease-Inhibitoren (Jarvis et al., 1995; Kaneto et al., 1994; Roggo et al., 1996).



**Abbildung 9:** Phenylspirodriman Stachybotryamid nach Hinkley et al. (1999)

Sie wirken stimulierend auf die Fibrino- und Thrombolyse und vereinen zyto- sowie neurotoxische Effekte, wobei die zytotoxischen Eigenschaften deutlich geringer ausfallen als bei den makrozyklischen Trichotheceninen (Jarvis et al., 1995; Nielsen, 2003; Pestka et al., 2008). Allerdings konnte eine signifikante Zytotoxizität von neu beschriebenen Phenylspirodrimanen von *S. chartarum* gegenüber verschiedenen humanen Tumorzelllinien nachgewiesen werden (Zhao et al., 2018).

### 2.1.5 Vorkommen von *S. chartarum*

*S. chartarum* wurde in Erdreich, totem Pflanzenmaterial sowie in Lebens- und Futtermitteln nachgewiesen (Barron und Peterson, 1968; Biermaier et al., 2015; Drobotko, 1945; Ellis, 1971) und ist ubiquitär verbreitet. Aufgrund seines ausgeprägten zellulolytischen Potenzials wächst *S. chartarum* bevorzugt auf feuchten und zellulosehaltigen Materialien wie Stroh und Heu, aber auch auf Bau- und Innenraummaterialien und tritt damit als Kontaminant in Gebäuden auf (Andersen et al., 2002; Kuhn et al., 2005; Nikulin et al., 1994). Sein Wachstum in Innenräumen wird durch vorangegangene Wasserschäden ermöglicht, da hohe Gehalte an freiem Wasser dazu nötig sind (Nielsen et al., 2004). Bei Beprobung von 200 Wohnhäusern mit Feuchteschäden in Houston (Texas) konnte in nahezu 60% der Gebäude ein Befall mit *Stachybotrys* spp. nachgewiesen werden (Kuhn et al., 2005).

#### 2.1.5.1 Futtermittel

Stroh, das sowohl als Einstreumaterial als auch als Futterzusatz für Nutztiere verwendet wird, ist häufig von *Stachybotrys* befallen (Drobotko, 1945; Harrach et al., 1983a). Stroh und Heu, insbesondere Gerstenstroh, scheinen ein ideales Substrat für das Wachstum von *S. chartarum* darzustellen (Danko, 1975; Harrach et al., 1987). Im Gliederungspunkt 2.1.6.2 werden in Tabelle 7 diese Matrices in Verbindung mit Krankheitsfällen beim Tier aufgegriffen.

El-Kady und Moubasher (1982) fanden in 83% der untersuchten Proben von ägyptischem Weizenstroh (n=50) Vertreter der Gattung *Stachybotrys*. Dabei trat *S. chartarum* am Häufigsten auf (164 von 166 Isolaten).

In einer Studie aus Russland zum Screening von Futtermittelproben auf Schimmelpilzbefall erwiesen sich 3,4% der 252 Proben als mit *Stachybotrys* befallen. Der größte Anteil mit 67,9% fiel auf die Gattung *Mucor*. Die Futtermittel umfassten Kraft-, Grün- und Mischfutter, wobei die Gattung *Stachybotrys* am häufigsten in Heu und Stroh nachgewiesen werden konnte. Die Probennahme erfolgte ganzjährig, wobei *Stachybotrys* am frequentesten im Frühjahr isoliert werden konnte (Ibragimova et al., 2021).

Auch in Tierfutter auf der Basis von Reis konnte *S. chartarum* in Indien nachgewiesen werden (Surekha et al., 2011).



Im Staub, der beim Dreschvorgang von Ackerbohnen entsteht, wurde *S. chartarum* in Ägypten isoliert (Gherbawy et al., 2021).

### 2.1.5.2 Lebensmittel

Einen Überblick über Vorkommen von *Stachybotrys* spp. in Lebensmittelmatrices gibt Tabelle 3. V. a. Getreide wie Gerste und Weizen werden befallen, aber auch getrocknete Lebensmittel und Genussmittel wie Pfeffer (Abdel-Hafez und El-Said, 1997), Küchenkräuter (Biermaier et al., 2015) und Tabak (Catania et al., 1998) wurden als kontaminiert beschrieben.

Des Weiteren konnte ein Befall von Sojabohnenwurzeln beschrieben werden, wobei *S. chartarum* als Verursacher einer Wurzelfäule auftrat (Li und Hartman, 2000).

Auch in Dörrzitrone konnte *Stachybotrys* sp. in einer Probe isoliert werden. Bei dem überwiegenden Teil der *Mycobiota*, die in dieser Studie in den Zitronen identifiziert werden konnte, handelte es sich allerdings um Aspergillen (Toma und Abdulla, 2013).

In Küchenkräutern konnten neben dem Nachweis von *S. chartarum* und *S. chlorohalonata* auch makrozyklische Trichothecene identifiziert werden (Biermaier et al., 2015).

**Tabelle 3:** Vorkommen von *Stachybotrys* spp. in Lebensmittelmatrices

Lebensmittel	Herkunft	Jahr	Referenz
<b>Gerste und Weizen</b>	Finnland	1973	(Korpinen, 1973)
<b>Gerste</b>	Iran	1994	(Nejat-Salari und Ershad, 1994)
<b>Gewürze</b>	Ägypten	1992	(El-Kady et al., 1992)
<b>Pfeffer, rot</b>	Ägypten	1997	(Abdel-Hafez und El-Said, 1997)
<b>Tabak</b>	n. b. <sup>1</sup>	1998	(Catania et al., 1998) <sup>2</sup>
<b>Sojabohnenwurzeln</b>	USA	2002	(Li et al., 2002)
<b>Heilkräuter</b>	Ägypten	2006	(Abdel-Hafez und El Naggar, 2006) <sup>3</sup>
<b>Dörrzitrone</b>	Irak	2013	(Toma und Abdulla, 2013)
<b>Küchenkräuter</b>	divers	2013	(Biermaier et al., 2015)

<sup>1</sup>nicht bekannt

<sup>2</sup>nach Li et al. (2002)

<sup>3</sup>nach Santos et al. (2013)

### 2.1.5.3 Innenräume und Umwelt

Das erste *Stachybotrys*-Isolat wurde 1837 von Corda in Prag aus einer Tapete isoliert (Corda, 1837). Rigipswände, Tapeten, Holzmöbel und ähnliche Materialien werden aufgrund der Zellulose spaltenden Eigenschaften von *Stachybotrys* bevorzugt befallen (Andersson et al., 1997; Gareis, 1994; Gottschalk et al., 2006; Jarvis et al., 1996; Van Reenen-Hoekstra et al., 1991).

Voraussetzung für einen Befall mit *S. chartarum* in Wohn- und Arbeitsräumen ist eine hohe Wasseraktivität in den betroffenen Baumaterialien, wie sie häufig nach einem Wasserschaden auftritt. Nielsen et al. (2004) konnten zeigen, dass allein das Auftreten von Kondensationsfeuchte keine ausreichend günstigen Bedingungen für ein Wachstum von *S. chartarum* bietet, oder zur Mykotoxinbildung führt.

In Gebäuden wie Archiven, Getreidelagerstätten und Bauernhöfen, aber auch in modernen Bürokomplexen mit Klimaanlage, ist Schimmelpilzwachstum nach Wasserschäden auf entsprechenden Materialien (siehe Tabelle 4) und eine inhalative Exposition der dort wohnhaften oder arbeitenden Personen möglich (Fischer und Dott, 2003; Fromme et al., 2016; Jarvis und Miller, 2005; Nielsen, 2003). Bisher ist nicht geklärt, ob Pilzsporen der Hauptvektor für Mykotoxinbelastung der Raumluft sind (Fromme et al., 2016). Es wurde gezeigt, dass auch kleinere Partikel als Sporen mit Pilzgiften behaftet sein können (Brasel et al., 2005). Da *S. chartarum* mit Toxinen angereicherte Guttationstropfen bilden kann, ist ein Übergang in die Raumluft möglich (Gareis und Gottschalk, 2014; Gareis et al., 2011; Mayer et al., 2007). Als weiterer Vektor für Mykotoxine in Innenräumen und Umwelt konnten Milben identifiziert werden. Deren Ausscheidungen könnten somit nicht nur als Allergen im Hausstaub fungieren, sondern auch Mykotoxine enthalten (Gareis und Göbel, 1998).

Auch aus Materialien wie Aluminiumfolie, Glaswolle und Rohrisoliermaterial wurde *S. chartarum* isoliert (Gravesen et al., 1999), wobei makrozyklische Trichothecene in den betroffenen Gebäuden festgestellt wurden.

**Tabelle 4:** Beispiele für das Vorkommen von *S. chartarum* auf Innenraummaterialien

<b>Matrix</b>	<b>Land</b>	<b>Jahr</b>	<b>Referenz</b>
<b>Luftproben</b>	Großbritannien	1983-1986	(Hunter et al., 1988)
<b>Luftfilter, Luftgehalt</b>	Finnland	1990-1991	(Reponen et al., 1994)
<b>Papier, Gips, Tapete</b>	Finnland	1993	(Nikulín et al., 1994)
<b>Gipswände, Holzmaterial (Küche), Isolationsmaterial aus Glaswolle</b>	USA	1998	(Johanning et al., 1998)
<b>Aluminiumfolie, Rohrisoliermaterial</b>	Dänemark	1999	(Gravesen et al., 1999)
<b>Tapete</b>	Deutschland	2008	(Gottschalk et al., 2008)
<b>Scheitholz, Isolationsmaterial aus Glaswolle, Gipswand</b>	USA	2010	(Skrobot et al., 2014; Skrobot III et al., 2017)
<b>Innenwände</b>	Thailand	2016	(Precha et al., 2020)
<b>Hackschnitzel, Glaswolle</b>	Deutschland	2020	(Jagels et al., 2020)

## 2.1.6 Bedeutung von *S. chartarum* als Verursacher von Intoxikationen

### 2.1.6.1 Mensch

*S. chartarum* wird im Zusammenhang mit dem Krankheitskomplex des Sick Building Syndrome (SBS) (Cooley et al., 1998; Johanning et al., 1999; Mahmoudi und Gershwin, 2000; Straus, 2009) genannt, einer multifaktoriellen Erkrankung, die unspezifische Symptome verursacht. SBS ist definiert durch Krankheitsanzeichen im oberen Respirationstrakt, Kopfschmerzen, Erschöpfung und Hautausschläge, die mit dem Aufenthalt von Personen in einem spezifischen Gebäude in Zusammenhang zu bringen sind (Redlich et al., 1997).

Bei diesem Krankheitskomplex, bei dem u.a. flüchtige organische Verbindungen (Hodgson et al., 1994), bakterielle Toxine (Teeuw et al., 1994) sowie physikalische Faktoren (Levin, 1995) als Ursachen diskutiert werden, kann *S. chartarum* nicht als alleiniger Verursacher verantwortlich gemacht werden. Seine Rolle ist umstritten (Terr, 2009).

In den 1990ern häuften sich Fälle von idiopathischem Lungenbluten bei Kleinkindern aus Wohnstätten mit vorhergehenden Wasserschäden in Cleveland (Ohio, USA) und rückten *S. chartarum* als mögliche Ursache in das Zentrum des medialen Interesses (Etzel et al., 1998; Miller et al., 2003). Im Zeitraum von 1993 bis 2000 erlagen 12 Kleinkinder unter den 41 Erkrankten den Symptomen. Da die Wohnungen infolge der Wasserschäden durch *S. chartarum* befallen waren, wird der hochtoxische Pilz mit den Erkrankungen in Verbindung gebracht (Dearborn et al., 2002).

Ob makrozyklische Trichothecene allein für die Ausbrüche von Lungenbluten bei Kleinkindern verantwortlich sind, ist umstritten. Es wird ein Zusammenspiel dieser Toxine mit anderen Sekundärmetaboliten diskutiert, die von der Gattung *Stachybotrys* produziert werden (z. B. Hämolysine) (Vesper et al., 2000; Vesper et al., 2001; Vesper und Vesper, 2002).

**Tabelle 5:** Krankheitsausbrüche bei Menschen im Zusammenhang mit *S. chartarum*

<b>Symptome/Erkrankung</b>	<b>Bevölkerungsgruppe</b>	<b>Land</b>	<b>Jahr</b>	<b>Referenz</b>
<b>Pulmonale Hämorrhagie</b>	Kleinkinder	USA	1993- 2000	((CDC), 2000; Dearborn et al., 2002; Etzel et al., 1996; Etzel et al., 1998)
<b>Grippeähnlich, Gastrointestinal, Fokale Alopezie, Gliederschmerzen</b>	Erwachsene, Teenager	USA	1980- 1985	(Croft et al., 1986)
<b>Respiratorisch, Zentralnervös Blutbildveränderungen</b>	Erwachsene	USA	1995	(Johanning et al., 1996)
<b>Asthma, Interstitielle Lungenerkrankung,</b>	Erwachsene	USA	1992- 1993	(Hodgson et al., 1998)
<b>Respiratorisch, Dermatologisch</b>	Erwachsene	Ukraine	1945	(Drobotko, 1945)
<b>Respiratorisch, Dermatologisch</b>	Erwachsene	Frankreich	1985	(Le Bars und Le Bars, 1985)
<b>Rhinitis, Dyspnoe, Konjunktivitis, Lethargie, Tussis</b>	Kinder/Erwachsene	Finnland	2004- 2009	(Mussalo- Rauhamaa et al., 2010)
<b>Sinusitis</b>	Immunsupprimierter Erwachsener	USA	2020	<sup>1</sup> (Semis et al., 2020)

<sup>1</sup> *S. chlorohalonata* war verantwortlich

Im Tiermodell rufen applizierte Sporensuspensionen von *S. chartarum* histologische Veränderungen und Entzündungen in Gewebe von Nase und Lunge von Mäusen hervor (Jabar et al., 2020). Eine Inhalation von mit Toxinen behafteten Sporen, die auch im Menschen solche Veränderungen hervorrufen könnte, kann nicht ausgeschlossen werden, besonders wenn die Schleimkapsel der Sporen austrocknet und Guttationströpfchen gebildet werden (Gareis und Gottschalk, 2014; Lemons et al., 2019).

Einer der ersten Fälle von Intoxikationen über die Atemluft wurde von Croft et al. (1986) berichtet. Die Symptome bei den Betroffenen ähnelten denen von Pferden, die mit kontaminiertem Stroh in Kontakt waren und unter Stachybotryotoxikose litten (Fromme et al., 2016) (siehe 2.1.6.2). In der Studie konnten in Luftstaubproben und Wandmaterial neben Sporen von *S. atra* auch makrozyklische Trichothecene isoliert werden. Nach Applikation von in

Ethanol gelöstem Probenmaterial in Ratten und Mäusen per os, verendeten alle Tiere innerhalb von 24 Stunden. Die Kontrollgruppe zeigte keinerlei Symptome. Auch in Deutschland konnten in Luftstaubproben einer mit *S. chartarum* kontaminierten Wohnung makrozyklische Trichothecene nachgewiesen werden (Gottschalk et al., 2008). Die meisten Proben von Staub aus Wohnumgebungen befinden sich allerdings unterhalb der Quantifizierungsgrenze in Bezug auf Satratoxine (Fromme et al., 2016).

Als invasives Pathogen war *Stachybotrys* bisher nicht bekannt, doch kürzlich wurde aus den Nasennebenhöhlen eines jungen Mannes (23 Jahre), der zuvor an Leukämie erkrankte, *S. chlorhalonata* isoliert. Der Patient wurde allerdings mit immunosuppressiven Kortikosteroiden behandelt, die vermutlich diese Infektion stark begünstigten (Semis et al., 2020).

#### 2.1.6.2 Tier

Zwischen 1920 und 1940 wurde in Ungarn und Russland über eine bis dahin nicht bekannte Krankheit in Nutztieren, insbesondere bei Pferden, berichtet. Dokumentiert wurden Blutungen, Geschwüre und Auflagerungen im Maulbereich von Pferden, aber auch Schockgeschehen und Todesfälle (Drobotko, 1945; Jarmai, 1929; Szathmary, 1983).

Diese zuerst als „unbekannte Krankheit“ (NZ = neizvestnoe zabolevanie) oder „Massenerkrankung“ (MZ = massovoe zabolevanie) bezeichnete Erkrankung wurde 1938 mit von *S. alternans* (*S. alternans* = *S. chartarum*) befallenem Stroh in den Ställen von betroffenen Pferden in Verbindung gebracht (Forgacs, 1972; Sarkisov, 1947) und als Stachybotryotoxikose bezeichnet. Die Symptome der Krankheit konnten durch Fütterung von kontaminiertem Futter erfolgreich provoziert werden (Dankó und Tanyi, 1968; Drobotko, 1945; Palyusik, 1970).

Die Stachybotryotoxikose bei Pferden gliedert sich je nach aufgenommener Toxinmenge und Dauer der Exposition in drei klinisch unterschiedliche Formen, die in Tabelle 6 dargestellt werden.

**Tabelle 6:** Formen und Symptome der Stachybotryotoxikose des Pferdes nach Forgacs (1972)

Klinische Formen	Stadium	Aufnahmemenge kontaminiertes Stroh	Inkubationszeit	Dauer	Symptome
<b>typisch</b>	1	Subletale Mengen der Toxine	2-10 Tage	8-30 Tage	Stomatitis; Fissuren Maulwinkel; Ödeme Kopfbereich; Lymphknotenschwellung
	2		5 Tage nach Stadium 1	5-20 Tage	Koagulopathie, Thrombozytopenie, Leukozytopenie
	3		k. a. <sup>1</sup>	1-6 Tage	Nekrosen Maulbereich; Hyperthermie bis 41,5°C; Apathie; schwacher Puls; Exitus
<b>atypisch</b>	n.a. <sup>2</sup>	Ca. 225g <sup>3</sup> , hochgradig kontaminiert über 10 Tage	10 Tage	k.a.	Hyperästhesie, Hyperreflexie, Visusverlust; Exitus durch Apnoe
<b>Schockform</b>		Sehr hohe Mengen über kurzen Zeitraum	k. a.	10-12 Stunden	Hyperthermie, Dyspnoe, Zyanosen, Hämorrhagien an Schleimhäuten, peraktuer Exitus

<sup>1</sup>Keine Angabe<sup>2</sup>Nicht anwendbar<sup>3</sup>nach Forgacs (1958)

Durch Kontakt mit den makrozyklischen Trichothecenen von *S. chartarum* kann auch bei anderen Tierarten mit ähnlichen Symptomen wie beim Pferd die Stachybotryotoxikose auftreten. Einen Überblick über Ausbrüche der Krankheit bei verschiedenen Tierarten gibt Tabelle 7.

**Tabelle 7:** Fälle von Stachybotryotoxikose bei diversen Tierarten

<b>Tierart</b>	<b>Matrix</b>	<b>Klinik</b>	<b>Land</b>	<b>Jahr</b>	<b>Referenz</b>
<b>Schaf</b>	Stroh	Lethargie, Epistaxis, Alopezie, Diarrhoe	Ungarn	1982	(Harrach et al., 1983a)
		Haemorrhagische Sepsis, Anämie, Leukopenie	Südafrika	1979	(Schneider et al., 1979)
<b>Rind (Kälber)</b>	Stroh	Hyperthermie, ruminale Atonie, Epistaxis, petechiale Hämorrhagien der Schleimhäute, Blutungsneigung	Rumänien	1990	(Ghergariu et al., 1990)
<b>Rind (Fresser = 200 bis 250 Kg)</b>	Stroh	Dermatitis, Pharyngitis, Laryngitis, Konjunktivitis	Bosnien und Herzegowina	1971	(Ozegovic et al., 1971)
<b>Geflügel</b>	Stroh	Haut-Erytheme, Hautnekrosen, krustöse Auflagerungen an den Ballen	Ungarn	1990	(Ivanics et al., 1990)
	Mais, gemahlen, Weizen	Hochgradige Salivation, Kachexie, Blässe der Adnexe, Nekrosen	Maryland (USA)	1962	(Schumaier et al., 1963)
<b>Schwein (laktierende Sauen/Ferkel)</b>	Stroh	Hautver- änderungen an Rüsselscheibe/Zitzen, Rhinitis	Ungarn	1960- 1970	(Szabó et al., 1970)
<b>Wild (Damwild, Tierpark)</b>	Stroh	Darmatonie, Hämorrhagien, Multiorganversagen	Frankreich (Umgebung Paris)	1975	(Le Bars et al., 1977)
<b>Hund (Rasse: Boxer)</b>	Stroh	Dermatitis, Ulcera, Epistaxis, katarrhalische Rhinitis	Ungarn	2005	(Szemerédi, 2005)

Mit Tierversuchen wie Fütterungsexperimenten mit kontaminiertem Material konnten die Symptome der Stachybotryotoxikose in Mäusen, Hasen, Meerschweinchen, Hunden, sowie in Hühnern künstlich reproduziert werden (Forgacs, 1972; Korneev, 1948; Schumaier et al., 1963).

## 2.2 Nachweismethoden

### 2.2.1 Phänotypisch

#### 2.2.1.1 Kultur- und Mikromorphologie

*S. chartarum* kann auf vielen Nährmedien erfolgreich kultiviert werden. Er wächst aber schlecht und sporuliert nicht auf Medien mit geringem Wassergehalt wie Dichloran-18% Glycerin-Agar (DG-18) oder DRYES (Samson et al., 2019).

Auf MEA sporulieren *Stachybotrys* spp. teilweise schlecht (Andersen und Nissen, 2000). Obwohl er gut für die Anzucht von Reinkulturen geeignet ist, besteht die Gefahr der Überwucherung von *Stachybotrys* spp. mit schnell wachsenden Schimmelpilzen bei der Anzucht von Mischkulturen (Hintikka, 1977), insbesondere wenn etwa Probenmaterial untersucht wird. Einen Selektionsvorteil gegenüber anderen Mikromyzeten erhält *Stachybotrys* bei Anzucht auf einem mit Van-Iterson-Medium angefeuchtetem sterilisiertem Papierfilter, da aufgrund der Fähigkeit Zellulose zu verstoffwechseln, das Papier als Kohlenhydratquelle dient (Bata et al., 1985; Hintikka, 1977).

Nach einer Arbeit von Andersen und Nissen (2000), in der 22 verschiedene Anzuchtmedien getestet wurden, eignet sich V8 mit antibiotischem Zusatz am besten zur Kultur von *Stachybotrys*, obwohl auch bei gutem Wachstum auf diesem Agar nicht alle getesteten Isolate versporten. Laut Andersen und Nissen (2000) müsste V8 neben den acht Gemüsesäften und Calciumcarbonat eine bisher unbekannte Substanz zugefügt werden, um als optimales Medium zu gelten. Nur auf Czapek Yeast Extract Sucrose 20% Agar (CY20S), Rice Meal Agar (RM), Oat Meal Agar (OAT) und Cornmeal Agar (CMA) war sowohl Wachstum als auch Versporung aller neun getesteten Isolate zu verzeichnen (siehe Tabelle 1). Auch die produzierte Menge an makrozyklischen Trichothecenen in Kulturen von *S. chartarum* scheint abhängig von der Zusammensetzung des Anzuchtmediums zu sein, wobei in einer kürzlich erfolgten Studie PDA und Cellulose Agar unter fünf verschiedenen Anzuchtmedien die höchsten Toxinmengen von *S. chartarum* aufwiesen (Ulrich und Schäfer, 2020).

Die einzelnen Spezies in der Gattung *Stachybotrys* sind durch morphologische Gesichtspunkte nicht sicher zu differenzieren. *S. chlorohalonata* unterscheidet sich von *S. chartarum* durch glatte Konidien und die Freisetzung von grünlichem Pigment in Kulturmedien (Andersen et al.,



2003). Die Unterscheidung anhand von mikroskopischen Details alleine ist kaum möglich (Wang et al., 2015b).

Viele Merkmale gleichen sich, auch Pinruan et al. (2004) beschreiben den nah verwandten *S. chlorohalonata* mit breiten ellipsoid bis obovoid geformten Konidien von einer schwarzgrünen Färbung. Die Konidiophoren werden als hyalin an der Basis und dunkel zur Spitze hin beschrieben. Als einziges Unterscheidungsmerkmal wird hier angeführt, dass die Konidien von *S. chartarum* eine geriffelte oder gebänderte Oberfläche haben. Da die Konidien des Pilzes oft in dicken Schleimkapseln verpackt sind (Samson et al., 2019), ist die Detektion von Sporen in der Luft nicht einfach (Došen et al., 2016).

## 2.2.2 Chemotypisch

### 2.2.2.1 Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie

Toxine und andere Substanzen können mittels Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) detektiert werden, auch wenn sie nur in sehr geringen Mengen in der zu untersuchenden Matrix vorhanden sind. Ein Gemisch aus dem Analyten und der Probenmatrix wird in der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit Hilfe von unterschiedlichen chemischen Interaktionen aufgetrennt. Die Zeitspanne, die ein Analyt in der Chromatographiesäule verweilt, wird mit den Retentionszeiten von Referenzsubstanzen verglichen, um eine Identifikation zu ermöglichen (Grebe und Singh, 2011).

Ein Elektrospray-Interface (ESI) fungiert als Schnittstelle zwischen der HPLC und dem Tandem-Massenspektrometer (Fenn et al., 1989). Die Probe wird unter Hochspannung vernebelt, anschließend fragmentiert und die Masse der spezifischen Fragmentionen in einem Massenspektrometer bestimmt. Durch den Vergleich des Fragmentmusters einer Substanz mit einer Bibliothek von Referenzsubstanzen erfolgt die Identifizierung einzelner Substanzpeaks. Auf diese Weise können die in der HPLC aufgetrennten und detektierten Substanzen eindeutig identifiziert werden.

Zwischen *S. chlorohalonata* und dem Chemotyp S von *S. chartarum* konnte von Andersen et al. (2002; 2003) zum ersten Mal mit Hilfe von LC-MS/MS unterschieden werden. Eine Differenzierung zwischen *S. chlorohalonata* und *S. chartarum* Chemotyp A war mit dieser Methode allerdings nicht möglich, da beide Pilze in der Lage sind Atranone zu bilden.

Gottschalk et al. (2006) konnten mit einer sensitiven LC-MS/MS Methode sowohl in Realproben aus Innenräumen als auch in mit Toxinen präparierten Proben makrozyklische Trichothecene nachweisen. Auch eine Belastung von Innenraumluft mit diesen hochtoxischen Giften konnte erfolgreich nachgewiesen werden (Gottschalk et al., 2008). Der Toxingehalt in den Guttationströpfchen von *S. chartarum* Kulturen konnte mit dieser Methode ebenfalls gemessen werden (Gareis und Gottschalk, 2014).

Referenztoxine für die nachzuweisenden Sekundärmetabolite von *Stachybotrys* spp. sind kommerziell kaum erhältlich, wodurch sich bisherige Ansätze auf einen semiquantitativen Nachweis durch das verfügbare *Stachybotrylactam* beschränkten. Diesen Nachteil konnten Jagers et al. (2019) durch die Charakterisierung von 15 Sekundärmetaboliten von *Stachybotrys* spp. als analytischen Standard ausgleichen.

Darüber hinaus konnte mithilfe der LC-MS/MS dargestellt werden, dass die Quantität der Produktion von makrozyklischen Trichothecenen maßgeblich von der Zusammensetzung des Anzuchtmediums abhängig ist. Die höchsten Konzentrationen wurden auf PDA gemessen (Ulrich und Schäfer, 2020). Welche Komponenten des jeweiligen Agars die Produktion dieser Extrolite begünstigen bzw. hemmen, ist jedoch noch nicht hinreichend bekannt (Ulrich und Schäfer, 2020).

#### 2.2.2.2 Immunoassays

Ein *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ist ein Verfahren zum Nachweis von Analyten durch immunochemische Reaktionen. Diese Methode liefert bei Messung einzelner Analyten quantitative und bei Testung von Gruppen (z. B. allgemein makrozyklische Trichothecene) durch Kreuzreaktion innerhalb der Gruppe semiquantitative Ergebnisse. Vorteile der Methode sind eine hohe Spezifität und Sensitivität sowie die hohe Toleranz gegenüber Matrixbestandteilen und Extraktionsrückständen (Pestka, 1988).

Ein ELISA zum Nachweis von makrozyklischen Trichothecenen als Gruppe wurde durch Märtlbauer et al. (1988) entwickelt. Der Test basiert auf dem Nachweis des makrozyklischen Trichothecens Roridin A und den Kreuzreaktionen mit Roridin J, Verrucarin A, Satratoxin H und Satratoxin G, wobei keine Differenzierung zwischen diesen Toxinen möglich ist. Die Antikörper für den Assay wurden durch subkutane Injektion eines Derivats des Roridin A-Hemisuccinat (gekoppelt an Humanalbumin) in Kaninchen erhalten. Diese Antikörper können nun als feste

Phase des Testsystems eingesetzt werden. Bei einer Hinzugabe von Toxinen konkurrieren diese mit den im Test enthaltenen enzymgekoppelten Giften um die Bindung an die verwendeten Antikörper, wodurch die Menge an makrozyklischen Trichothecenen umgekehrt proportional zur optischen Dichte eines in einer anschließenden Enzymreaktion entstehenden Farbstoffes ist (kompetitiver ELISA). Bei Testung von 16 einfachen Trichothecenen zeigten lediglich Diacetylverrucarol und Verrucarol geringgradige Kreuzreaktionen mit dem Assay.

Auch auf Basis von Antikörpern gegen Satratoxin G konnte 2003 ein spezifischer ELISA für Satratoxine entwickelt werden. Hier wurde statt an Humanalbumin an bovines Serumalbumin gekoppelt und in Kaninchen injiziert, um Antikörper zu erhalten (Chung et al., 2003). Der Test zeigte geringgradige Kreuzreaktionen mit Deoxynivalenol und Verrucarol.

### 2.2.2.3 Bioassays

Der erstmalig 1983 beschriebene MTT (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazoliumbromid)-Zellkulturtest ist ein Verfahren zum Nachweis der Zytotoxizität einer Probe (Mosmann, 1983). Dieser Test liefert im Gegensatz zu vorhergenannten Methoden als biologisches Verfahren Hinweise zur Toxizität einer Probe als Summenparameter. Der Assay ist als diagnostischer non-target Test konzipiert, mit dem zytotoxische Effekte gemessen werden (Gareis, 2006).

Dem Testprinzip liegt die Spaltung des gelben Tetrazoliumsalzes MTT zu violetten Formazan-Kristallen in gesunden Zellen zugrunde (Altman, 1976). Als Zielzellen eignen sich Schweine-Nierenzellen (SK), humane Lymphozyten oder humane Zervixkarzinomzellen (HeLa-Zellen), wobei sich SK-Zellen als einerseits empfindlich für Mykotoxine, andererseits unempfindlich für störende Matrixeffekte erwiesen (Gareis, 1994; Gareis, 2006). Bei Applikation einer Verdünnungsreihe der zytotoxischen Probe auf SK-Zellen wird nach der Inkubationszeit der Grad der Zellschädigung gemessen. Geschädigte Zellen spalten das gelbe Tetrazoliumsalz nicht oder nur ungenügend, wodurch ein Farbumschlag nach violett durch Entstehung von Formazanen erreicht wird. Das Ergebnis wird durch photometrische Messung bestimmt.

Der  $IC_{50}$ -Wert evaluiert die Ergebnisse des MTT-Testes. Dieser Wert beschreibt die niedrigste Konzentration pro Milliliter Zellkulturmedium, die die Spaltungsaktivität (MTT-Spaltung zu Formazanen) der exponierten Zellen um 50% reduziert.

In Tabelle 8 sind IC<sub>50</sub>-Werte für diverse Mykotoxine dargestellt. Es stellt sich ein deutlicher Unterschied im Zytotoxizitätslevel zwischen makrozyklischen Trichothecenen und anderen pilzlichen Extroliten dar.

**Tabelle 8:** Zytotoxizitätswerte verschiedener Mykotoxine im MTT-Zellkulturtest an SK-Zellen, nach Gareis (2006)

Name Mykotoxin	Synthesefähige Spezies	Anzahl Testungen	IC <sub>50</sub> in µg/ml	Referenz
Roridin A	<i>Myrothecium</i> spp. / <i>Bachharris</i> spp.	4	0,0010	(Busam und Habermehl, 1982; Härrri et al., 1962; Jarvis et al., 1981)
Satratoxin G	<i>S. chartarum</i>	5	0,0073	
Satratoxin H	<i>S. chartarum</i>	5	0,0146	
Deoxynivalenol	<i>Fusarium graminearum</i>	31	16,93	(Kushiro, 2008)
Aflatoxin B1	<i>Aspergillus flavus</i>	4	21,88	(Busby und Wogan, 1984)
Alternariol	<i>Alternaria</i> spp.	6	91,67	(Cole und Cox, 1981)
Penitrem A	<i>Penicillium</i> spp.	3	266,67	(El-banna et al., 1987)
Zearalenon	<i>Fusarium</i> spp. / <i>Giberella</i> spp.	3	>400,00	(Marasas et al., 1984; Stob et al., 1962)

## 2.2.3 Genotypisch

### 2.2.3.1 PCR

Die Polymerase-Chain-Reaction (PCR) wurde vielfach zur genetischen Identifikation von Organismen aus der Gruppe der *Mycota* verwendet. Auch für den Nachweis von mykotoxin-bildenden Pilzen wird die Methode häufig eingesetzt (Magan und Olsen, 2004; Niessen, 2007). Alle Schimmelpilze besitzen den internal transcribed spacer (ITS)-locus (White et al., 1990), der oft zur Identifizierung herangezogen wird (Hibbett und Taylor, 2013). In dieser Region ist keine Unterscheidung der Genotypen von *S. chartarum* möglich. Die beiden Spezies *S. chartarum* und *S. chlorohalonata* unterscheiden sich lediglich in einem einzigen Basenaustausch in dieser Region (Andersen et al., 2003; Haugland und Heckman, 1998).

Die nahverwandte und weit weniger zytotoxische Art *S. chlorohalonata* lässt sich anhand von Sequenzen aus dem ITS-Bereich des pilzlichen rRNA Gens, oder auch von Genen wie *chs1*, *tub2* und *tri5* von *S. chartarum* unterscheiden. Mit dem Genabschnitt *tub2*, welcher für das Protein Beta-Tubulin codiert, kann allerdings keine Differenzierung zwischen den Genotypen erfolgen (Andersen et al., 2003).

Die partielle Gensequenz der mitogen-aktivierten Protein-Kinase *hogA* (Lewińska et al., 2016) aus *Aspergillus nidulans*, ist für die Identifizierung von *S. chartarum* ein weiterer potenzieller Kandidat. Es dürfte sich hierbei um ein homologes Gen (Kosswig, 1961) mit vermutlich gemeinsamem evolutionären Ursprung handeln. Allerdings zeigten *Chaetomium* spp. Kreuzreaktionen in der PCR mit *hogA* spezifischen Primern (Lewińska et al., 2016), wodurch es weiterer Forschung an diesem Genlocus bedarf, um ihn zur sicheren Identifizierung von *S. chartarum* heranzuziehen.

Für die Unterscheidung der zwei bisher bekannten Chemotypen von *S. chartarum* konnte das kodierende Gen für die Trichodiensynthase (*tri5*) (Cruse et al., 2002) oder das Gen für die Chitin-Synthase (*chs1*) (Jollès und Muzzarelli, 1999) benutzt werden (Andersen et al., 2003). In den Genloci wurde anhand einer Basensubstitution zwischen den Chemotypen A und S unterschieden. Dazu war es jedoch jeweils nötig, das PCR-Produkt zu sequenzieren.

### 2.2.3.2 Multiplex PCR

Basierend auf der Entdeckung von Toxin-Clustern im Genom von *S. chartarum* und *S. chlorohalonata* (Semeiks et al., 2014), konnte eine Multiplex PCR zum Nachweis der Genotypen von *S. chartarum* erstellt werden (Ulrich et al., 2019).

Der Genotyp S besitzt alle 21 SAT-Gene der drei Satratoxin-Cluster (SC1-SC3). Diese Gene befähigen den Pilz als Chemotyp S in Kultur makrozyklische Trichothecene zu bilden. Der Genotyp A hingegen, der für den Atranon-produzierenden Chemotyp A des Pilzes codiert, besitzt keines der SAT-Gene, aber alle ATR-Gene (Atranon-Gene). In der Arbeit wurde ein dritter Genotyp beschrieben, der aufgrund eines inkompletten Sets der SAT-Gene weder dem Genotyp A noch dem Genotyp S zugeordnet werden konnte, und der deshalb als Hybrid-Typ (Genotyp H) neu beschrieben wurde.

Mit der ursprünglichen Absicht, einen Assay für die PCR-basierte Unterscheidung von Stämmen der beiden Chemotypen S und A von *S. chartarum* sowie von *S. chlorohalonata* zu entwickeln, verwendeten Ulrich et al. (2019) drei Primerpaare, die in einer Multiplex PCR eingesetzt wurden.

Die Grundlage für das Primerdesign bildeten Sequenzen von Genen der Satratoxin-Biosynthese (*sat*-Cluster) und der Atranon-Biosynthese (*atr*-Cluster), die von Semeiks et al. (2014)

beschrieben wurden.

Ein Primerpaar wurde für den Nachweis des *sat19* Gens entworfen, welches spezifisch in Satratoxin-bildenden Stämmen auftritt. Nach Semeiks et al. (2014) besitzen Stämme des Chemotyps A von *S. chartarum* ein Cluster von *atr*-Genen anstelle der *sat*-Gene, weshalb sie typischerweise Atranone anstelle von Satratoxin G produzieren. Daher wurde ein Primerpaar für den Nachweis von Atranon-bildenden Stämmen (Chemotyp A) auf der Grundlage des *atr6* Gens entworfen.

Nachdem eine vergleichende Analyse der DNA-Sequenzen der *atr*-Gene von *S. chartarum* Chemotyp A und *S. chlorohalonata* große Unterschiede zwischen den Sequenzen der jeweiligen *atr4* Gene ergeben hatte, wurden Primer für dieses Gen entworfen, mit denen sich *S. chlorohalonata* spezifisch nachweisen ließ. Es wurde erwartet, dass Stämme des Chemotyp S ein PCR Produkt mit dem *sat19* spezifischen Primerpaar bilden. Stämme des Chemotyp A würden ein PCR Produkt mit dem Primerpaar *atr6* bilden und *S. chlorohalonata* Stämme werden durch ein Produkt mit dem *atr4* spezifischen Primerpaar angezeigt.

Untersuchungen mit den drei Primerpaaren in einer Multiplex PCR zeigten jedoch, dass unter den ursprünglich mit Hilfe der *tri5* Sequenzierung (siehe oben) identifizierten Stämmen des Chemotyps S, einige die Anwesenheit sowohl des *sat19* Gens als auch des *atr6* Gens aufwiesen. Da dieses Ergebnis nicht den Erwartungen entsprach, wurde untersucht, welche der Gene in den *sat*- und *atr*-Clustern bei den betreffenden Isolaten vorhanden waren oder fehlten.

Es zeigte sich, dass alle Isolate, die sowohl mit dem Primerpaar SAT19 als auch mit dem Primerpaar ATR6 ein PCR-Produkt bildeten, nicht in der Lage waren, Satratoxin G zu bilden, obwohl sie nach *tri5*-Gen Sequenzierung dem Chemotyp S zugerechnet worden waren. Spätere Analysen der Gene in den verschiedenen Genclustern zeigten, dass sich alle Stämme, die beide Banden in der Multiplex-PCR zeigten, durch das Fehlen bestimmter Gene (SAT11-SAT16, einschließlich) von den Stämmen unterschieden, die sich mit der Multiplex-PCR klar einem der beiden Chemotypen zuordnen ließen (siehe Ulrich et al., 2019).

In Anlehnung an die jeweilige genetische Disposition wurde *S. chartarum* daraufhin neu in drei Genotypen unterteilt: Genotyp A (keine *sat*-Gene vorhanden, alle *atr*-Gene vorhanden), Genotyp S (alle *sat*-Gene vorhanden, keine *atr*-Gene vorhanden), Genotyp H (*sat*-Gene *sat11-sat16* fehlend, *atr*-gene vorhanden).

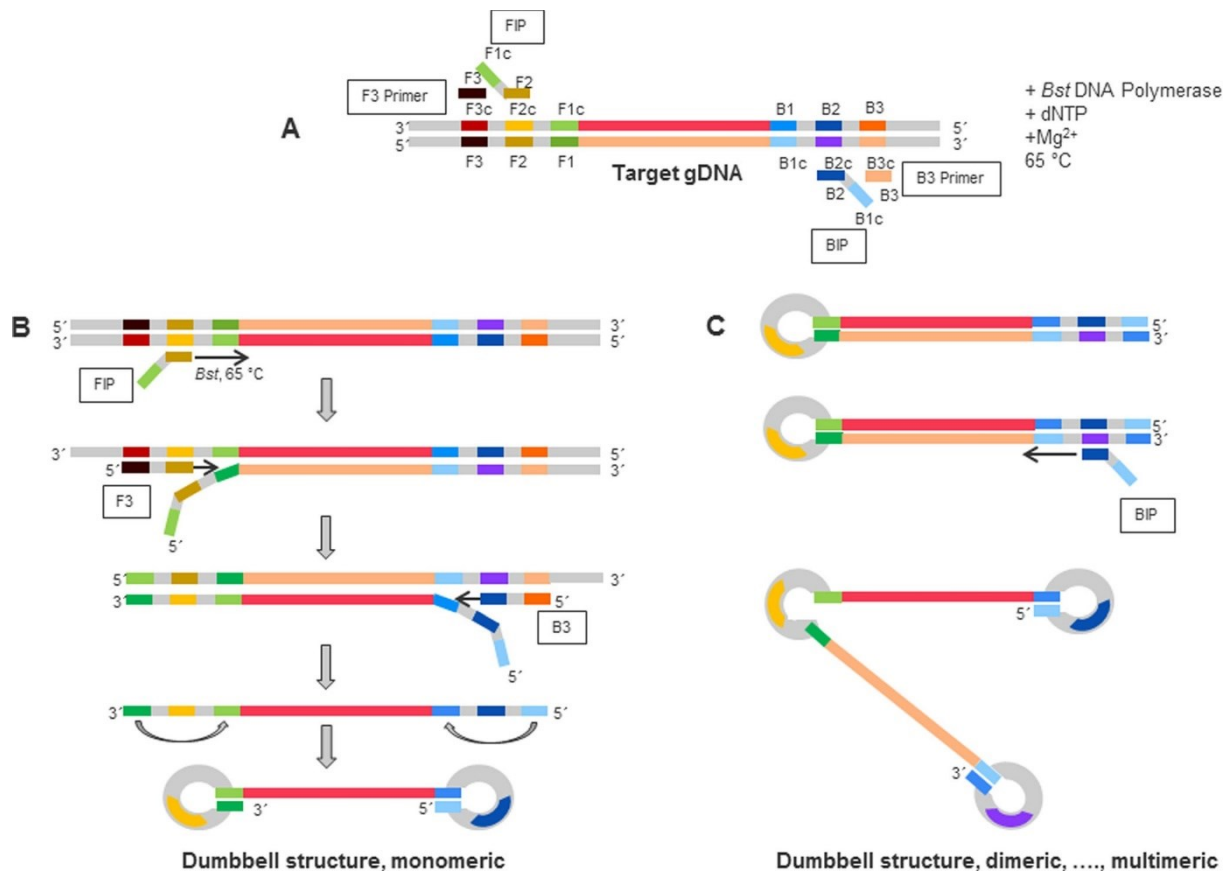
Chemische Untersuchungen zur Satratoxin G Bildung zeigten, dass ausschließlich Stämme des

Genotyps S in der Lage waren, dieses Mykotoxin in Kultur zu bilden. Da nur der Genotyp S von *S. chartarum* die Gene *sat11* bis *sat16* trägt, konnten diese Gene als Grundlage für das im Rahmen der vorliegenden Dissertation entwickelte Nachweisverfahren für Satratoxin-bildende Stämme von *S. chartarum* verwendet werden.

### 2.2.3.3 LAMP Assay

Bei dem Nukleinsäureamplifikationsverfahren *Loop-mediated-Isothermal-Amplification* (LAMP) wird wie bei der konventionellen PCR mithilfe von an Ziel-DNA hybridisierenden Oligonukleotid-Primern die anschließende enzymatische Vervielfältigung der DNA bewerkstelligt. Im Unterschied zur PCR wird bei der LAMP aber ein Set von vier verschiedenen Primern, die an sechs unterschiedlichen Bindungsstellen der Ziel-Sequenz andocken, eingesetzt (Notomi et al., 2000).

Des Weiteren wird eine spezielle Polymerase mit Strangtrennungs-Aktivität, die *Bst*-Polymerase (aus *Geobacillus stearothermophilus*) verwendet. Die Reaktion läuft nicht wie bei der PCR in thermalen Zyklen ab, sondern wird unter isothermen Bedingungen (im Bereich von 65°C) in 15 bis 60 Minuten ausgeführt. Um die Reaktion noch effizienter zu gestalten und die Menge an amplifizierter DNA bezogen auf die Reaktionszeit zu vergrößern, kann ein zusätzliches Primerpaar (loop-Primer) zur Reaktion hinzugefügt werden (Nagamine et al., 2002). Ein Schema der LAMP-Reaktion zeigt Abbildung 10. Danach läuft eine LAMP-Reaktion wie folgt ab:



**Abbildung 10:** Schematische Darstellung einer LAMP-Reaktion (Niessen, 2015). Beschreibung siehe nachfolgenden Text

**A:** Darstellung des Forward Inner Primer (FIP), Backward Inner Primer (BIP) und der F3 und B3 Primer und die entsprechenden Bindungsstellen an der Ziel-DNA. Die Primer werden zusammen mit der Ziel-DNA in einem Puffer gelöst, der die *Bst* Polymerase sowie Magnesium und Deoxynukleotide bei einem pH-Wert von 8,8 enthält. Die Inkubation der Mischung erfolgt bei konstanter Temperatur von ca. 65 °C.

**B:** Die Reaktion beginnt mit der Bindung der äußeren (F3 und B3) und der inneren Primer (FIP und BIP) an die Ziel-DNA, wobei die als F1c und B1c bezeichneten Teile der zusammengesetzten äußeren Primer ungebunden bleiben. Anschließend elongiert die *Bst*-Polymerase gleichzeitig sowohl die Bereiche F2 und B2 der FIP und BIP Primer, als auch die äußeren Primer F3 und B3 von den jeweiligen 3' Enden aus. Dabei schiebt sich das Syntheseprodukt der F3 und B3 Primer unter das neu entstehende Produkt, welches durch Verlängerung der FIP und BIP Primer entsteht und verdrängt diese von ihrem jeweiligen Matrixstrang. Da dieser Vorgang gleichzeitig auf beiden Strängen der Ziel-DNA stattfindet, entstehen zwei einzelsträngige



Produktstränge, an deren beiden Enden sich durch das Anlagern der als F1c und B1c bezeichneten Teile der FIP und BIP Primer an einen weiter stromabwärts gelegenen komplementären Sequenzbereich sich schleifenförmige Strukturen (loop) ausbilden, die als Hantelstruktur (*dumbbell structure*) bezeichnet werden.

**C:** Die exponentielle Vervielfältigung des LAMP-Produkts startet nun ausgehend von diesem hantelförmigen Produkt, da es Bindungsstellen für den F2- und B2-Bereich der FIP und BIP Primer besitzt, an denen jeweils durch die *Bst*-Polymerase eine Elongation stattfindet.

Auch finden sich hier Bindungsstellen für loop-Primer, die ihrerseits zur Bildung neuer Hantelstrukturen und damit zu einer Vermehrung von neuen Ausgangspunkten für eine Amplifikation führen.

Da die LAMP Reaktion keinen Schritt beinhaltet, bei dem die neu entstandenen Produktstränge voneinander getrennt werden (wie dies bei der PCR während des Aufschmelzschrittes nach jedem Elongationsschritt geschieht), entstehen hier Konkatemere, die aus unterschiedlich vielen Einheiten des initialen dumbbell-Produktes bestehen.

Dies ist an der typischen Leiterstruktur zu erkennen, wenn LAMP-Reaktionen gelelektrophoretisch aufgetrennt werden. Hierbei zeigen sich Banden mit zunehmender Fragmentlänge zwischen ca. 150 bp bis hin zu mehreren Kilobasenpaaren. Entscheidend für die Spezifität der Reaktion ist dabei, dass es nur dann zu einer DNA-Synthese kommt, wenn alle Primer korrekt an die Ziel-DNA binden.

LAMP wurde im Bereich der Mykologie als erstes von Endo et al. (2004) zum Nachweis von *Paracoccidioides brasiliensis*, dem Erreger der Paracoccidioidomykose, eingesetzt. Der signifikante Vorteil der LAMP-Methode zur bereits etablierten PCR zum Nachweis des Pathogens ist die Halbierung der für einen Nachweis benötigten Zeit (Endo et al., 2004).

Darüber hinaus können auch lebensmittelrelevante Schimmelpilze mit dieser Methode nachgewiesen werden. Das Phänomen des Überschäumens von in Flaschen gefülltem Bier nach dem Öffnen wird als *gushing* bezeichnet.

Als Auslöser des Überschäumens wurde unter anderen das durch *Fusarium spp.* gebildete Protein Hyd5p identifiziert (Sarlin et al., 2005).

Ein LAMP-Assay wurde zum Nachweis des für das Protein kodierenden *hyd5* Gens in *Fusarium* Spezies entwickelt. Dieser Assay kann nun für die Qualitätskontrolle des Malzes in Brauereien

und Mälzereien benutzt werden um etwaige Kontaminationen mit *Fusarium* spp. im Vorfeld des Brauprozesses identifizieren (Denschlag et al., 2012, 2013).

Auch Mykotoxin-bildende Schimmelpilze wurden bereits per LAMP-Assay nachgewiesen. Man unterscheidet zwischen Assays, die eine ganze Gruppe von Spezies nachweisen, und Assays, die einzelne Arten von Mykotoxinbildnern nachweisen können (Niessen, 2018).

So konnte für die wichtige Gruppe der Aflatoxin-bildenden Schimmelpilze unter der Sektion *Flavi* der Gattung *Aspergillus* ein gruppenspezifischer LAMP-Assay entwickelt werden, der in der Lage ist alle 15 Arten dieser Aflatoxin B und G bildenden Gruppe nachzuweisen (Niessen et al., 2018).

Das Pilzgift Patulin, hauptsächlich von Spezies der Gattung *Penicillium* (v.a. *Penicillium expansum*) (Morales et al., 2008) produziert, kann ebenfalls mit einem gruppenspezifischen LAMP-Assay indirekt nachgewiesen werden. Die Arbeit von Frisch und Niessen (2019) beruht auf dem Nachweis der Gensequenz *idh* (Isoepoxydon Dehydrogenase) aus dem Syntheseweg der Patuline. Bis auf Isolate von *Aspergillus clavatus* konnten alle getesteten Patulinbildner (darunter Arten der Gattungen *Penicillium*, *Aspergillus*, *Byssochlamys* und *Paecilomyces*) erfolgreich nachgewiesen werden.

Ein weiterer gruppenspezifischer LAMP-Assay konnte zum Nachweis von einfache Trichothecene bildende *Fusarium* spp. entwickelt werden (Denschlag et al., 2014). Es handelt sich hierbei um einen LAMP-Assay, bei dem einerseits für die *tri6* Gensequenz in *Fusarium graminearum* und andererseits für die *tri5* Gensequenz in *Fusarium sporotrichoides* je ein Primerset entwickelt wurden.

Die Kombination dieser Primer in einem Duplex-Assay führte zur erfolgreichen gruppenspezifischen Identifizierung von sechs verschiedenen trichothecenbildenden Arten innerhalb der Gattung *Fusarium*.

Wigmann et al. (2020) entwickelten erfolgreich einen Assay zum Nachweis von Fumonisin synthetisierenden *Fusarium* spp. und konnten 22 dieser Arten nachweisen.

Für wichtige Mykotoxinbildner existieren auch artspezifische LAMP-Assays. So gelingt z. B. der indirekte Nachweis von Aflatoxin (*Aspergillus flavus*) (Lee et al., 2015), von Patulin (*Penicillium expansum*) (Frisch et al., 2021), oder von Zearalenon/Deoxinivalenol (*Fusarium graminearum*) (Niessen und Vogel, 2010).

---

Die Applikation der Methode auf *S. chartarum* zum Nachweis des hochtoxischen Chemotyp S war Gegenstand der vorliegenden Dissertation und wird in der nachfolgenden Publikation beschrieben und diskutiert.

### 3 Publikation

Analytical and Bioanalytical Chemistry

Received: 9 March 2021 /Revised: 25 May 2021 /Accepted: 26 May 2021

DOI: 10.1007/s00216-021-03436-y / Copyright 2021, Springer Nature Switzerland AG.

## Rapid and selective detection of macrocyclic trichothecene producing *Stachybotrys chartarum* strains by loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

Johannes Köck<sup>1</sup>, Christoph Gottschalk<sup>1</sup>, Sebastian Ulrich<sup>2</sup>, Karin Schwaiger<sup>3</sup>, Manfred Gareis<sup>1</sup>, Ludwig Niessen<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Chair of Food Safety, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University Munich, Schoenleutnerstr. 8, 85764 Oberschleissheim, Germany

<sup>2</sup>Chair for Bacteriology and Mycology, Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University Munich, Veterinaerstraße 13, 80539 Munich, Germany

<sup>3</sup>Institute for Food Safety, Food Technology and Veterinary Public Health, Unit of Food Hygiene and Technology, University of Veterinary Medicine, Veterinärplatz 1, A-1210 Vienna, Austria

<sup>4</sup>Chair of Technical Microbiology, TUM School of Life Sciences, Technical University of Munich, Gregor-Mendel-Str. 4, 85354 Freising, Germany

#### Corresponding author:

Ludwig Niessen. Chair of Technical Microbiology, TUM School of Life Sciences, Technical University of Munich, Gregor-Mendel-Str. 4, 85354 Freising, Germany  
E-mail: niessen@mytum.de

## Abstract

Cytotoxic macrocyclic trichothecenes such as satratoxins are produced by chemotype S strains of *Stachybotrys chartarum*. Diseases such as stachybotryotoxicosis in animals and the sick building syndrome as a multifactorial disease complex in humans have been associated with this mold and its toxins. Less toxic non-chemotype S strains of *S. chartarum* are morphologically indistinguishable from chemotype S strains, which results in uncertainties in hazard characterization of isolates. To selectively identify macrocyclic trichothecene producing *S. chartarum* isolates, a set of *sat14* gene-specific primers was designed and applied in a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay using neutral red for visual signal detection. The assay was highly specific for *S. chartarum* strains of the macrocyclic trichothecene producing chemotype and showed no cross reaction with non-macrocytic trichothecene producing *S. chartarum* strains or 152 strains of 131 other fungal species. The assay's detection limit was 0.635 pg/rxn (picogram per reaction) with a reaction time of 60 min. Its high specificity and sensitivity as well as the cost-saving properties make the new assay an interesting and powerful diagnostic tool for easy and rapid testing.

**Keywords:** Stachybotryotoxicosis, Sick building syndrome, Indoor air quality, Water damage, Diagnostic test kit, *sat14* gene

## Introduction

The dematiaceous hyphomycete fungus *Stachybotrys (S.) chartarum* (Ehrenb.) S. Hughes plays an important role as a potential health hazard for humans [1, 2] and animals [3] due to its production of highly toxic secondary metabolites, known as mycotoxins. Especially macrocyclic trichothecenes such as satratoxins [4], that are produced by *S. chartarum* chemotype S strains, have a high cytotoxic potential [5]. In horses and other animals, a disease known as stachybotryotoxicosis was described already in 1945 [6, 7]. The disease's symptoms are catarrh with hemorrhage and ulceration of the mucosae of mouth, nose and throat, followed by lymphadenopathy with fever, leucopenia, agranulocytic anemia and death. They result from the ingestion of moldy fodder that had been contaminated with *S. chartarum* and its associated mycotoxins. Moreover, also inhalation of *S. chartarum* contaminated farm dust and spores were demonstrated to result in clinical signs of stachybotryotoxicosis in animals and farm workers [8]. Skin contact with farm dust and moldy straw bedding resulted in a moist dermatitis with crusts of dried serous exudation in farm animals and workers.

Besides its role in stachybotryotoxicosis, *S. chartarum* was discussed as being involved in fatal cases of pulmonary hemorrhage in infants, which occurred in the 1990s after extensive flooding in Cleveland, Ohio [9, 10]. The toxic fungus was regularly isolated from water damaged cellulosic materials such as wallpapers, plasterboard, or wood [11-14]. Other studies confirmed this correlation [15, 16]. Moreover, *S. chartarum* has been associated with the sick-building syndrome [17, 18], a difficult to define medical condition that is caused by multiple factors from the indoor environment of a building. Even though some of the implications that *S. chartarum* might have on humans are under discussion today [19, 20], its negative influence on animal health and the involvement of macrocyclic trichothecenes in its pathology are beyond doubt. The detection of airborne macrocyclic trichothecenes proved that exposure to these toxins is possible by inhalation [21-23]. Furthermore, also foodstuffs such as dried culinary herbs were recently reported to be a possible vector of *Stachybotrys chartarum* [24].

Since *S. chartarum* is a hazardous fungus, the distinction of strains that produce rather harmless atranones from strains that produce highly toxic macrocyclic trichothecenes is of high importance for the estimation of the toxicological potential of animal feed and food as well as for the hazard assessment of indoor environments. The distinction of strains according to chemotypes has been achieved in the past by using liquid chromatography with mass-

spectrometry analysis for identification of compounds (LC-MS/MS) [25, 26] or through cytotoxicity testing of culture extracts using the MTT assay [27, 28]. However, both methods are complex, expensive and time-consuming because fungal isolates must be cultivated up to three weeks [27] for analytes to be produced. Indirect methods such as micro- and macro-morphology of cultures and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) failed to distinguish highly toxic strains from others [29, 30]. Distinguishing chemotypes also failed with polymerase chain reaction (PCR) assays that were based either on sequences of the 18S rRNA gene [31] or the ITS1-5.8S-ITS2 rRNA gene region [32]. With a C to T exchange in nucleotide position 279 of the *tri5* gene, Andersen et al. distinguished between genotype S and genotype A in strains of *S. chartarum* [26, 33]. However, this distinction was only poorly correlated with the two chemotypes of the species. A recent study has found, that the two chemotypes known in *S. chartarum* are represented by three different genotypes instead of two [34]. In contrast to genotypes A and H (both atranone producing chemotype A), strains of genotype S produce satratoxins F, G, and H and other highly toxic macrocyclic trichothecenes like Verrucarin J, Roridin E and L-2 (chemotype S) [35, 36]. It was demonstrated that this genotype exclusively harbors the complete set of 21 genes in the *sat*-cluster that is necessary for the production of macrocyclic trichothecenes. Chemotype A strains were either devoid of *sat*-genes (genotype A) or the gene cluster was incomplete (genotype H). In particular, genes *sat11* through *sat16* were exclusively present in strains that produced macrocyclic trichothecenes in culture [34].

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a DNA-based molecular technology that uses a set of four oligonucleotide primers, which need to hybridize to six different locations in the genome of a target organism before enzymatic autocycling *in vitro* biosynthesis of DNA occurs under isothermal conditions at 65 °C [37, 38]. Advantages of LAMP over PCR-based assays are their higher reaction speed, simplicity of application and reduced proneness to inhibitors present in sample materials. Its characteristics make LAMP an ideal tool for point of analysis (POA) applications. Due to the application of color change reactions, a visual readout of results can be performed with the naked eye immediately after the reaction has been terminated. Among other organisms, various assays have been designed for the specific detection of filamentous fungi and yeasts [39]. Only recently, the group-specific detection of the *fum1*-gene in fumonisin producing *Fusarium* spp. in maize [40] was successfully demonstrated. Another example for the application of LAMP to the detection of mycotoxin

producing fungi is the detection of patulin producers among *Penicillium* species and its application to the analysis of grapes and apples [41].

The goals of the current study were to set up and optimize a LAMP-based assay for the selective identification of macrocyclic trichothecene producing (genotype S) strains of *S. chartarum* and to determine its characteristics (sensitivity, selectivity).

## Materials and methods

### Chemicals

Tris-HCL and EDTA were purchased from Gerbu Biotechnik GmbH (Heidelberg, Germany). Sodium chloride, sodium acetate, isopropyl alcohol and dimidium bromide were purchased from Karl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Germany). SDS was purchased from SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Germany). Ethanol analytical grade and acetic acid were purchased from VWR International (Radnor, PA, USA). DNA loading buffer and DNA Ladder GeneRuler 100bp were purchased from Thermo Fisher Scientific INC. (Waltham, MA, USA). HPLC-grade water was used in all experiments unless stated otherwise and was purchased from J.T. Baker (Center Valley, USA).

### Fungal cultures and culture conditions

A complete list of 227 fungal isolates used during the current study is given in table S1 (see supplemental materials). Strains of *S. chartarum* (CBS 414.95, CBS 129.13 and CBS 324.65) were used as reference strains for the genotypes and used for validation and as controls during method development. Cultures were obtained upon direct request to the institutions given as sources. Fungal stock cultures were maintained in glycerol at -80 °C as described by Niessen et al. [42]. Working cultures of all strains were grown on 2.0 % malt extract agar plates (MEA, 20 g/L malt extract, 2 g/L soy peptone, and 15 g/L agar (Difco, Heidelberg, Germany), adjust to pH 5.4). Prior to use, all media were sterilized by autoclaving at 121 °C for 15 min. All cultures were grown at ambient temperature (AT, 22 ± 1 °C) for 7 days. Agar cultures were inoculated with a small piece of mycelium from working culture plates and incubated for 5 d at AT. For DNA extraction, cultures were grown in 500 µL of malt extract broth in sterile 1.5 mL reaction vessels at AT on a horizontal shaker at 80 rpm.



### **LC-MS/MS measurement**

Detection of macrocyclic trichothecenes (satratoxin G, H, and F; roridine E and L-2; verrucarins J) produced by the tested isolates in this study was performed in previous studies by our working group. The LC-MS/MS system consisted of a HPLC device (Shimadzu LC-20AB, SIL-20AC HT, CTO-20AC, CBM-20A, Duisburg, Germany) coupled to an API 4000 triple quadrupole mass spectrometer (Sciex, Darmstadt, Germany). In brief, strains were cultivated on MEA agar for 21 d at 25 °C and plates were extracted by treating in a bag mixer with 50 ml acetonitrile/water 84/16 (v/v). An aliquot (5 mL) of the extract was evaporated to dryness and the residues were reconstituted in 1 mL acetonitrile/water 30/70 (v/v). The limits of detection (LOD) were calculated using the signal-to-noise approach and ranged between 0.1 and 7.8 ng/g MEA agar. For detailed information regarding sample preparation, substance-specific and measurement parameters, refer to Ulrich et al. [34].

### **DNA-isolation and amplification**

DNA-extraction from fungal cultures was performed using the protocol described in [43] with some modifications. We used 1.5 mL Eppendorf tubes as culture vessels, containing 500 µL malt extract broth (see above, no agar added). Tubes were inoculated with a loop-full of fungal conidia and incubated horizontally at AT on a rotary shaker at 150 rpm for 2 d. Following centrifugation at 17,900 x g for 5 min and washing with 500 µL of sterile HPLC-grade water, mycelial pellets were mixed with sterile glass beads (1,25-1,65 mm diameter, Carl Roth, Karlsruhe, Germany), sea sand (Merck, Darmstadt, Germany), 300 µL extraction buffer (200 mM Tris-HCl (Gerbu Biotechnik, Heidelberg, Germany), 250 mM sodium chloride (Carl Roth, Karlsruhe, Germany), 25 mM EDTA (Gerbu), 0.5 % (w/v) SDS (SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Germany) and treated in a tissuelyser (45 s; 5.5 m/s, Fastprep®-24, MP Biomedicals Germany, Eschwege, Germany) to release genomic DNA from cells. The remaining steps were performed as described in Cenis et al. [43]. Vacuum dried genomic DNA was suspended in sterile HPLC-grade water. DNA concentrations were monitored using a NanoDrop ND1000 spectrophotometer (Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Germany) according to the manufacturer's recommendations.

### **PCR amplification of target DNA**

Chemotype-specific triplex-PCR with DNA of *S. chartarum* isolates was performed using the Taq Core Kit 10 (MP Biomedicals) with the primers and cycling protocol described in [34]. The

PCR-products were separated on 1.3 % agarose gel (Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Germany) at 120 V and 200 mAmp for 1 h and subsequently stained in a dimidium bromide bath for 10 minutes. Gels were subsequently washed with deionized water for 10 min before visual analysis on a UV-transilluminator (UVT-28 M, Herolab, Wiesloch, Germany). PCR products were purified directly from amplification reactions using the QIAquick PCR Purification Kit according to the manufacturer's instructions (QIAGEN, Hilden, Germany). PCR- and LAMP-products that were excised from agarose gels with a scalpel were purified using the MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to manufacturer's instructions.

#### **LAMP amplification of target DNA**

Primer design was done, using the Primer Explorer V5 online software (Eiken Chemical CO., LTD., Tokyo, Japan). The master mix for one LAMP-reaction contained 2.5  $\mu$ L 10x ammonium sulfate buffer (100 mM ammonium sulfate (Gerbu), 100 mM potassium chloride (Carl Roth), pH 8.7), 1  $\mu$ L magnesium chloride (200 mM, Carl Roth), 3.5  $\mu$ L dNTPs mix (10 mM each GATC, MP Biomedicals GmbH, Eschwege, Germany), 2.6  $\mu$ L primer mix (1.6  $\mu$ M each FIP and BIP, 0.8  $\mu$ M each LF and LB, 0.2  $\mu$ M each F3 and B3 final concentration in master mix, see table 1 for primer sequences), 0.75  $\mu$ L formamide (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany), 1  $\mu$ L *Bst* polymerase (8 U/ $\mu$ L, New England BioLabs, Frankfurt am Main, Germany), 1  $\mu$ L neutral red (2.5 mM, SERVA Electrophoresis), 7.65  $\mu$ L sterile deionized UV treated water and 5  $\mu$ L of template DNA per 25  $\mu$ L of reaction volume. The assay was incubated at 65.5 °C for 60 min in a Mastercycler gradient thermal cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). Genomic DNA of strain *S. chartarum* CBS 414.95 was used as positive control and sterile HPLC-grade water was used as negative control throughout the study. Assays for validation were performed in triplicates.

A few reactions were performed with the ESEQuant TS real-time fluorimeter (QIAGEN Lake Constance GmbH, Stockach, Germany) to determine the effect of our loop primers on the reaction. V13 (V13-01184, Dyomics GmbH, Jena, Germany) was used as a fluorescent indicator dye instead of neutral red using all other reaction components as previously described.

## Assay validation

Cross-reactions in the assay were eliminated by increasing formamide concentration (see Fig. S2 in ESM) and temperature (see Fig. S1 in ESM). The presence of the correct amplified LAMP product in positive LAMP reactions was confirmed by sequence analysis of the smallest DNA fragment visible when LAMP reactions were separated by agarose gel electrophoresis. The smallest amplified product was cut out from the gel and a PCR with the primers F2 and B2 (part of FIP and BIP, see table 1) was done with the purified DNA fragment as template. Subsequently, the PCR product was isolated as described previously and Sanger sequenced using primers F2 and B2. Sequences were pairwise aligned and a consensus sequence was generated.

The effect of loop primers LF and LB (see table 1) on the reaction speed is a helpful parameter for the fine-tuning of a LAMP assay. We measured this effect in a real-time ESE Quant TS tube scanner fluorimeter (QIAGEN Lake Constance, Germany) using the V 13-01184 fluorescent dye (Dyomics, Jena, Germany) as indicator.

The sensitivity of the assay was analyzed by testing a serial dilution of *S. chartarum* CBS 414.95 gDNA as template.

## Results

### Development and optimization of the LAMP assay

A set of LAMP primers, including loop primers, were designed using the Primer Explorer V5 software. Since *S. chartarum* genotypes A and H, as well as *S. chlorohalonata* lack the presence of the satratoxin core cluster 2 (SC2) [34, 44], we designed our primer set (see table 1) to hybridize with the *sat14* gene exclusively present in SC2 of genotype S strains of *S. chartarum* (= chemotype S). If a strain belongs to chemotype S, the primers hybridize with the *sat14* gene and DNA is amplified during the LAMP reaction. Positive results are visualized by a color change from yellow to pink and can be read with the naked eye due to the utilization of neutral red as pH-indicator. Cross reactions in our LAMP were eliminated step by step by adding formamide to the master mix and increasing the reaction temperature, thus making the reaction more specific. At low temperatures and without the addition of formamide to the reaction, the binding of the primers became unspecific which led to cross-reactions with

several of the tested fungal species. Highly specific reactions occurred however, when 0,75  $\mu\text{L}$  of formamide was added per reaction. Optimization experiments using the temperature gradient function of the thermal cycler revealed 65.5  $^{\circ}\text{C}$  with a reaction time of 60 min as optimum reaction conditions for the rapid, sensitive and specific amplification of target DNA.

The alignment of the obtained sequence with the *sat14* gene sequence is shown in figure 1. Results showed a 100 % homology between both sequences confirming the correct binding and specificity of the designed primers.

Figure 2 shows the influence of both loop primers on the reaction speed. Using purified gDNA of *S. chartarum* CBS 414.95 as template, the LAMP reaction showed no measurable signal within 90 min runtime when none of loop primers LF or LB were added. Addition of either of primers LF or LB resulted in a LAMP signal starting at about 50 min runtime. A fluorescent signal that emerged from the background after only 20 min was detected in the LAMP reaction when both primers LF and LB were added to the master mix.

The sensitivity of the optimized assay was analyzed by the addition of purified gDNA from *S. chartarum* CBS 414.95 as template from a 10-fold serial dilution. Figure 3 shows that the addition of template DNA from a  $10^{-5}$  dilution still resulted in a visible color change when neutral red was used as an indicator that changes color from yellow to pink when the pH drops during positive LAMP reactions. This dilution was equivalent to a concentration of 6.35 pg template DNA per reaction. *S. chartarum* has a haploid genome size of 36.5 Mbp. Therefore, the limit of detection of the LAMP assay translates into a genomic copy number of 15.8 cp/reaction. Since the *sat14* gene is a single copy gene, the assay can detect a limit of 15.8 theoretical cells per reaction [44].

During the current study, a total of 227 fungal isolates were analyzed using the newly developed LAMP assay (see Table S1 in ESM). The tested isolates included 75 strains of *S. chartarum* (see Table 2). Among the tested *S. chartarum* strains, 30 genotype S, 29 genotype A and 14 genotype H were identified by triplex PCR according to [34]. Three strains (CBS 414.95, CBS 129.13 and CBS 324.65) were used as reference strains for the genotypes. Two strains (S1344, IBT 8935) could not be assigned to any of the genotypes using triplex PCR but reacted positive in the LAMP assay. LAMP with all *S. chartarum* genotype S strains resulted in a positive signal whereas all strains of genotypes A and H showed negative results in the LAMP assay. Also included in the total of the tested strains were 29 strains of other *Stachybotrys*

species including 21 strains of the closely related *S. chlorohalonata* as well as one strain each of eight other *Stachybotrys* species and two strains of *Memnoniella echinata* as a more remotely related species (for all *S. chartarum* see ESM Table S1). None of the tested strains reacted positive in the LAMP assay. In order to test unrelated species, 121 isolates of fungal species were tested that potentially occur in environments in which *S. chartarum* can be found (plant material, indoor environments, straw bedding). All isolates tested negative with the gene-specific LAMP assay.

Every isolate of the 30 *S. chartarum* Chemotype S which all had a positive result in the *sat14* specific LAMP reaction showed the production of macrocyclic trichothecenes in culture as measured by LC-MS/MS in previous studies [24, 34, 45, 46]. Table 3 shows the isolates with underlying data for LC-MS/MS compared to LAMP results. Genotypes A and H, as well as closely related *Stachybotrys* species neither showed a positive reaction in the new LAMP assay nor did they produce any of the analyzed macrocyclic trichothecenes. As an exception the isolate *S. dichroa* ATCC 18913 was reported to produce roridin E [36] and verrucarins J [46], but lacks the ability to produce satratoxins. However, it correctly proved negative in the LAMP assay.

Specificity testing performed during the current study demonstrated clearly that the designed set of LAMP primers selectively bind to the DNA of genotype S strains of *S. chartarum*. No cross-reactions were detected with non-satratoxin producing strains (genotypes A and H) or with closely related *Stachybotrys* species. Also, the various other tested fungal species did not result in positive LAMP reactions. In order to reach these results, the assay conditions needed to be optimized regarding incubation temperature and the addition of formamide to the master mix to reduce cross-reactions. Moreover, adding an additional pair of loop primers resulted in a considerable reduction of the reaction time as compared to the reaction time without loop primers.

## Discussion

According to Semeiks et al. [44], 21 genes are necessary in *S. chartarum* to produce satratoxins. Previous studies showed that only those strains of the fungus are able to produce satratoxins that harbor the full set of genes in their genomes, including genes *sat11* through

*sat16* (the satratoxin core cluster 2 (SC2) genes) [34]. Moreover, it was demonstrated that non-satratoxin producing strains of *S. chartarum* could have two different genotypes, which either have none of the *sat*-genes or miss *sat11* through *sat16* (the SC2). In some genotype H strains, also some of the genes in SC1 and SC3 seemed to be missing or truncated [34]. In order to differentiate satratoxin-producing strains from non-satratoxin producing strains of *S. chartarum*, we based our assay on the detection of sequences from one of the genes in SC2. Comparing *sat*-gene sequences of two strains of *S. chartarum* for which annotated genomic sequences are available, we found that the *sat14* gene showed the lowest number of mismatches and SNPs. Moreover, the gene had the lowest number of introns among the six genes in SC2. Both features present in high numbers would bear a potential of designing primers that will not properly hybridize to the DNA of all strains of the target species.

As we pointed out earlier, the LAMP reaction is characterized by a high level of sensitivity so that even small amounts of DNA lead to a positive result. On the other hand, too high DNA concentrations can inhibit the amplification and may lead to false negative results. Thus, measuring concentrations and diluting samples correctly is important. Particular care should be taken with false negative samples when testing on site, as no purified DNA sample is tested and therefore a reliable measurement of DNA concentration as well as occurring reaction inhibitors in the sample are problems to be dealt with. With an adequate adjustment of reaction temperature and formamide concentration, false positive reactions were completely excluded and did not occur among the tested isolates in this study.

The isolate *S. dichroa* ATCC 18913 revealed a negative result in the *sat14* specific LAMP reaction. However, it was previously shown that this isolate produced the macrocyclic trichothecenes roridin E [36] and verrucarin J [46], but no satratoxins. Our LAMP reaction amplifies the *sat14* gene which the fungus needs to synthesize this specific group of toxins and that in turn corresponds to an absence of *sat14*. This observation highlights ambiguities in the metabolite profile of *Stachybotrys* species, which is still part of ongoing research [47, 48].

During the current study we used neutral red as a pH-sensitive indicator for in-tube indirect visible signal detection under daylight conditions. The advantage of this indicator compared to turbidimetric or fluorescence-based detection of LAMP signals [49] is that results can be read visually without the need for a device such as a turbidimeter, fluorimeter or even a UV

lamp. Moreover, neutral red can be added to the master mix before the reaction starts, is non-toxic for those handling it [50] and does not interfere with the LAMP reaction. This indicator was used successfully in several previous studies [40, 51, 52]. Furthermore, a big advantage is the minimization of possible lab space contamination with product DNA. This is because a color change indicates a positive reaction, and no further handling of the DNA, like gel electrophoresis, is needed. Optimization and specificity testing were performed using genomic DNA after isolation from pure culture mycelia. As was reported in literature, LAMP assays can also be successfully performed using direct addition of fungal spores as template [42, 53-55]. However, during the current study it turned out that direct addition of spore material of *S. chartarum* genotype S strains into the master mix did not lead to reliable results (results not shown). Mechanical disruption of the spores by vortexing with and without glass beads, as well as thermal treatment did not result in the release of sufficiently reproducible gDNA amounts that are needed for a reproducible output of the LAMP assay. We assume that factors such as melanin [29] and polysaccharides from the cell wall and proteinases from the cytoplasm might inhibit the polymerase used in the LAMP reaction. Moreover, DNases might lead to the rapid digestion of the genomic DNA, hampering its detection by the assay. A working on-site application could contain a portable DNA extraction kit and a portable battery operated heating device like the ESEQuant TS real-time fluorimeter (QIAGEN Lake Constance GmbH, Stockach, Germany), which was used in this study. As already mentioned, experiments with direct measurement of spores and also with a strongly simplified DNA extraction were not successful by our working group, but we suggest experimental approaches using glass beads/sea sand or similar disruption media combined with vortexing and/or thermal disruption to get usable amounts of DNA for LAMP. Thermal treatment was used successfully by Jayanath et al. in detecting Hepatitis B virus in human serum by LAMP [56]. However, according to our experience it takes higher efforts to disrupt the rigid cell walls of fungal spores. Another study showed that human serum has an inhibitory effect on LAMP reactions [57]. Also this observation coincides with our experience of inhibitory fungal cell components such as DNases. An approach to exclude such components from extracts could be a syringe-filter based DNA extraction like the one described by Lee et al. [58]. The most simple way of LAMP analysis of fungi is the direct addition of spores or mycelia into the LAMP master mix as demonstrated by several studies [42, 53, 55, 59]. All chemicals that we used in the current LAMP assay can be transported on-site, e.g. in an ice box. For long time storage of LAMP

reagents without cooling, freeze drying of the master mix might be an alternative. However, further research is needed here.

Macrocyclic trichothecenes such as satratoxins are hazardous to the health of farm animals and humans living or working in moldy environments. To detect these toxins in feed, food or environmental samples, contaminated materials can be analyzed by LC-MS/MS, ELISA, MTT tests [21-23, 27, 28, 60]. Such tests are more or less expensive and time consuming because samples have to be sent to a testing facility with special instrumentation, while LAMP is a format that involves little costs, time and equipment and could potentially be applied even in the field [61, 62]. Therefore, the assay developed during the current study may pave the way for the development of rapid test kits for animal feed and bedding materials and for testing of indoor environments in human dwellings and workplaces. For the implication of these tests to field conditions, further research is needed to set up sample preparation protocols for the rapid direct analysis of sample materials.

**Supplementary Information:** The online version contains supplementary material available at: <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03436-y>.

**Acknowledgements:** Thanks to Andrea Pape, Barbara Fritz, Verena Hohenester, and Erika Altgenug for their technical support. Thanks to Prof. Dr. Rudi F. Vogel for the friendly admission at his institute in Freising-Weihenstephan.

**Author contribution:** All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection, and analysis were performed by Johannes Köck and Ludwig Niessen. The first draft of the manuscript was written by Johannes Köck and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript. Conceptualization: Johannes Köck; project administration: Ludwig Niessen; writing—original draft: Johannes Köck; writing—review and editing; Christoph Gottschalk; validation: Karin Schwaiger and Christoph Gottschalk; methodology: Sebastian Ulrich; supervision: Manfred Gareis.

**Funding:** Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. This research received funding from Brigitte and Wolfram Gedek Foundation, Ismaning, Germany.



**Code availability:** Not applicable.

**Data availability:** All methods and materials have been described in full. All used cultures are available from public strain collections as indicated in the text or are available from the authors' in house collection on request.

## **Declarations**

**Ethics approval:** Not applicable.

**Consent to participate:** Not applicable.

**Consent for publication:** Not applicable.

**Competing interests:** The authors declare no competing interests.

## References

1. Etzel RA. *Stachybotrys*. Current Opinion in Pediatrics. 2003;15(1):103-6.
2. Johanning E, Yang C. Health problems related to fungal exposure—the example of toxigenic *Stachybotrys chartarum*. Eastern New York Occupational Health Program—CHP. 1994:169-82.
3. Forgacs J, Carll WT, Herring AS, Hinshaw WR. Toxicity of *Stachybotrys atra* for animals. Trans New York Acad Sci. 1958;20(8):787-808.
4. Jarvis BB, Salemme J, Morais A. *Stachybotrys* toxins. 1. Natural Toxins. 1995;3(1):10-6. <https://doi.org/10.1002/nt.2620030104>.
5. Nielsen C, Casteel M, Didier A, Dietrich R, Märtlbauer E. Trichothecene-induced cytotoxicity on human cell lines. Mycotox Res. 2009;25(2):77-84. <https://doi.org/10.1007/s12550-009-0011-5>.
6. Drobotko VG. Stachybotryotoxicosis. A new disease of horses and humans. Am Rev Soviet Med. 1945;2:238-42.
7. Scudamore KA, Livesey CT. Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. J Sci Food Agric. 1998;77(1):1-17. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199805\)77:1<1::AID-JSFA9>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199805)77:1<1::AID-JSFA9>3.0.CO;2-4).
8. Hintikka E-L, Nikulin M. Airborne mycotoxins in agricultural and indoor environments. Indoor Air. 1998;8(S4):66-70. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0668.1998.tb00011.x>.
9. Etzel R, Montana E, Sorenson WG, Kullman G, Miller JD, Jarvis B et al. Pulmonary Hemosiderosis Associated With Exposure to *Stachybotrys Atra*: T 78. Epidemiology. 1996;7(4):S38.
10. Etzel RA, Montana E, Sorenson WG, Kullman GJ, Allan TM, Dearborn DG. Acute pulmonary hemorrhage in infants associated with exposure to *Stachybotrys atra* and other fungi. Arch Pediatr Adolesc Med. 1998;152(8):757-62. <https://doi.org/10.1001/archpedi.152.8.757>.
11. Gravesen S, Nielsen PA, Iversen R, Nielsen KF. Microfungal contamination of damp buildings - Examples of risk constructions and risk materials. Environ Health Pers. 1999;107:505-8.
12. Nielsen KF, Thrane U, Larsen TO, Nielsen PA, Gravesen S. Production of mycotoxins on artificially inoculated building materials. Int Biodet Biodeg. 1998;42(1):9-16. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(98\)00038-9](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(98)00038-9).
13. Andersson MA, Nikulin M, Koljalg U, Andersson MC, Rainey F, Reijula K et al. Bacteria, molds, and toxins in water-damaged building materials. Appl Environ Microbi. 1997;63(2):387-93. <https://doi.org/10.1128/AEM.63.2.387-393.1997>.
14. Andersen B, Frisvad JC, Sondergaard I, Rasmussen IS, Larsen LS. Associations between fungal species and water-damaged building materials. Appl Environ Microbi. 2011;77(12):4180-8. <https://doi.org/10.1128/AEM.02513-10>.
15. Dearborn DG, Smith PG, Dahms BB, Allan TM, Sorenson WG, Montana E et al. Clinical profile of 30 infants with acute pulmonary hemorrhage in Cleveland. Pediatrics. 2002;110(3):627-37. [doi:https://doi.org/10.1542/peds.110.3.627](https://doi.org/10.1542/peds.110.3.627).

16. Dearborn DG, Yike I, Sorenson WG, Miller MJ, Etzel RA. Overview of investigations into pulmonary hemorrhage among infants in Cleveland, Ohio. *Environ Health Pers.* 1999;107:495-9. <https://doi.org/10.1289/ehp.99107s3495>.
17. Johanning E, Biagini R, Hull D, Morey P, Jarvis B, Landsbergis P. Health and immunology study following exposure to toxigenic fungi (*Stachybotrys chartarum*) in a water-damaged office environment. *Int Arch Occup Environ Health.* 1996;68(4):207-18. <https://doi.org/10.1007/BF00381430>.
18. Cooley JD, Wong WC, Jumper CA, Straus DC. Correlation between the prevalence of certain fungi and sick building syndrome. *Occup Environ Med.* 1998;55(9):579-84. <https://doi.org/10.1136/oem.55.9.579>.
19. (CDC) CfDCaP. Update: Pulmonary hemorrhage/hemosiderosis among infants--Cleveland, Ohio, 1993-1996. *Morbidity and Mortality Weekly Report.* 2000;49(9):180-4.
20. Terr AI. Sick Building Syndrome: is mould the cause? *Med Mycol.* 2009;47(Supplement\_1):S217-S22. <https://doi.org/10.1080/13693780802510216>.
21. Gottschalk C, Bauer J, Meyer K. Detection of satratoxin g and h in indoor air from a water-damaged building. *Mycopathologia.* 2008;166(2):103-7. <https://doi.org/10.1007/s11046-008-9126-z>.
22. Bloom E, Bal K, Nyman E, Must A, Larsson L. Mass spectrometry-based strategy for direct detection and quantification of some mycotoxins produced by *Stachybotrys* and *Aspergillus spp.* in indoor environments. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(13):4211-7. <https://doi.org/10.1128/AEM.00343-07>.
23. Brasel TL, Martin JM, Carriker CG, Wilson SC, Straus DC. Detection of airborne *Stachybotrys chartarum* macrocyclic trichothecene mycotoxins in the indoor environment. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(11):7376-88. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7376-7388.2005>.
24. Biermaier B, Gottschalk C, Schwaiger K, Gareis M. Occurrence of *Stachybotrys chartarum* chemotype S in dried culinary herbs. *Mycotoxin Res.* 2015;31(1):23-32. <https://doi.org/10.1007/s12550-014-0213-3>.
25. Gottschalk C, Bauer J, Meyer K. Determination of macrocyclic trichothecenes in mouldy indoor materials by LC-MS/MS. *Mycotoxin Res.* 2006;22(3):189-92. <https://doi.org/10.1007/BF02959275>.
26. Andersen B, Nielsen KF, Thrane U, Szaro T, Taylor JW, Jarvis BB. Molecular and phenotypic descriptions of *Stachybotrys chlorohalonata sp. nov.* and two chemotypes of *Stachybotrys chartarum* found in water-damaged buildings. *Mycologia.* 2003;95(6):1227-58. <https://doi.org/10.1080/15572536.2004.11833031>.
27. Gareis M, Gottschalk C. *Stachybotrys spp.* and the guttation phenomenon. *Mycotoxin Res.* 2014;30(3):151-9. <https://doi.org/10.1007/s12550-014-0193-3>.
28. Gareis M. Diagnostischer Zellkulturtest (MTT-Test) für den Nachweis von zytotoxischen Kontaminanten und Rückständen. *J Verbraucherschutz Lebensmittelsich.* 2006;1(4):354-63. <https://doi.org/10.1007/s00003-006-0058-6>.
29. Ulrich S, Biermaier B, Bader O, Wolf G, Straubinger RK, Didier A et al. Identification of *Stachybotrys spp.* by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2016;408(27):7565-81. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9800-9>.

30. Gruenwald M, Rabenstein A, Remesch M, Kuever J. MALDI-TOF mass spectrometry fingerprinting: a diagnostic tool to differentiate dematiaceous fungi *Stachybotrys chartarum* and *Stachybotrys chlorohalonata*. *J Microbiol Meth.* 2015;115:83-8. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.05.025>.
31. Cruz-Perez P, Buttner MP, Stetzenbach LD. Specific detection of *Stachybotrys chartarum* in pure culture using quantitative polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes.* 2001;15(3):129-38. <https://doi.org/10.1006/mcpr.2001.0347>.
32. Haugland RA, Vesper SJ, Wymer LJ. Quantitative measurement of *Stachybotrys chartarum* conidia using real time detection of PCR products with the TaqMan(TM)fluorogenic probe system. *Mol Cell Probes.* 1999;13(5):329-40. <https://doi.org/10.1006/mcpr.1999.0258>.
33. Cruse M, Telerant R, Gallagher T, Lee T, Taylor JW. Cryptic species in *Stachybotrys chartarum*. *Mycologia.* 2002;94(5):814-22. <https://doi.org/10.2307/3761696>.
34. Ulrich S, Niessen L, Ekruth J, Schäfer C, Kaltner F, Gottschalk C. Truncated satratoxin gene clusters in selected isolates of the atranone chemotype of *Stachybotrys chartarum* (Ehrenb.) S. Hughes. *Mycotoxin Res.* 2019. <https://doi.org/10.1007/s12550-019-00371-x>.
35. Jarvis BB, Eppley RM, Mazzola EP. Chemistry of trichothecenes - Chemistry and bioproduction of macrocyclic trichothecenes. In: Ueno Y, editor. *Trichothecenes - Chemical, Biological and Toxicological Aspects.* Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.; 1983. p. 20-38.
36. Andersen B, Nielsen KF, Jarvis BB. Characterization of *Stachybotrys* from water-damaged buildings based on morphology, growth, and metabolite production. *Mycologia.* 2002;94(3):392-403. <https://doi.org/10.1080/15572536.2003.11833204>.
37. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucl Acids Res.* 2000;28(12):e63-e. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>.
38. Notomi T, Mori Y, Tomita N, Kanda H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *J Microbiol.* 2015;53(1):1-5. <https://doi.org/10.1007/s12275-015-4656-9>.
39. Niessen L. Current state and future perspectives of loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based diagnosis of filamentous fungi and yeasts. *Appl Microbiol Biotech.* 2015;99(2):553-74. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6196-3>.
40. Wigmann ÉF, Meyer K, Cendoya E, Maul R, Vogel RF, Niessen L. A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) based assay for the rapid and sensitive group-specific detection of fumonisin producing *Fusarium spp.* *Int J Food Microbiol.* 2020;325:108627. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108627>.
41. Frisch LM, Niessen L. Development and optimization of a group-specific loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of patulin-producing *Penicillium* species. *Int J Food Microbiol.* 2019;298:20-30. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.03.010>.
42. Niessen L, Vogel RF. Detection of *Fusarium graminearum* DNA using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Int J Food Microbiol.* 2010;140(2):183-91. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.036>.
43. Cenis JL. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucl Acids Res.* 1992;20(9):2380-. <https://doi.org/10.1093/nar/20.9.2380>.

44. Semeiks J, Borek D, Otwinowski Z, Grishin NV. Comparative genome sequencing reveals chemotype-specific gene clusters in the toxigenic black mold *Stachybotrys*. BMC Genomics. 2014;15(1):590. doi:<https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-590>.
45. Ekruth J, Gottschalk C, Ulrich S, Gareis M, Schwaiger K. Differentiation of *S. chartarum* (Ehrenb.) S. Hughes Chemotypes A and S via FT-IR Spectroscopy. Mycopathologia. 2020;185(6):993-1004. <https://doi.org/10.1007/s11046-020-00495-0>
46. Ulrich S-U. Charakterisierung ausgewählter Isolate von *Stachybotrys spp.* anhand kulturmorphologischer, molekularbiologischer und massenspektrometischer Verfahren: Imu; 2016.
47. Ding Z-G, Ding J-H, Zhao J-Y, Chunyu W-X, Li M-G, Gu S-J, et al. A new phenylspirodrimane dimer from the fungus *Stachybotrys chartarum*. Fitoterapia. 2018;125:94-7. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.12.022>
48. Jagels A, Lindemann V, Ulrich S, Gottschalk C, Cramer B, Hübner F, et al. Exploring Secondary Metabolite Profiles of *Stachybotrys spp.* by LC-MS/MS. Toxins. 2019;11(3):133. <https://doi.org/10.3390/toxins11030133>
49. Denschlag C, Vogel RF, Niessen L. Hyd5 gene based analysis of cereals and malt for gushing-inducing *Fusarium spp.* by real-time LAMP using fluorescence and turbidity measurements. Int J Food Microbiol. 2013;162(3):245-51. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.019>.
50. Borenfreund E, Puerner J A (1985). Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. Tox Lett. 1985; 24(2-3): 119-124.
51. Tanner NA, Zhang Y, Jr. TCE. Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. Biotechniques. 2015;58(2):59-68. <https://doi.org/10.2144/000114253>.
52. Niessen L, Bechtner J, Fodil S, Taniwaki MH, Vogel RF. LAMP-based group specific detection of aflatoxin producers within *Aspergillus* section *Flavi* in food raw materials, spices, and dried fruit using neutral red for visible-light signal detection. Int J Food Microbiol. 2018;266:241-50. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.013>.
53. Luo J, Taniwaki MH, Iamanaka BT, Vogel RF, Niessen L. Application of loop-mediated isothermal amplification assays for direct identification of pure cultures of *Aspergillus flavus*, *A. nomius*, and *A. caelatus* and for their rapid detection in shelled Brazil nuts. Int J Food Microbiol. 2014;172:5-12. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.001>.
54. Niessen L, Luo J, Denschlag C, Vogel RF. The application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in food testing for bacterial pathogens and fungal contaminants. Food Microbiol. 2013;36(2):191-206. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.04.017>.
55. Denschlag C, Vogel RF, Niessen L. Hyd5 gene-based detection of the major gushing-inducing *Fusarium spp.* in a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. Int J Food Microbiol. 2012;156(3):189-96. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.009>.
56. Jayanath NY, Nguyen LT, Vu TT, Tran LD. Development of a portable electrochemical loop mediated isothermal amplification (LAMP) device for detection of hepatitis B virus. RSC Adv. 2018;8(61):34954-9. <https://doi.org/10.1039/C8RA07235C>.
57. Ihira M, Akimoto S, Miyake F, Fujita A, Sugata K, Suga S, et al. Direct detection of human herpesvirus 6 DNA in serum by the loop-mediated isothermal amplification method. J Clin Virol. 2007;39(1):22-6. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2007.02.001>.

58. Lee S, Khoo VSL, Medriano CAD, Lee T, Park S-Y, Bae S. Rapid and in-situ detection of fecal indicator bacteria in water using simple DNA extraction and portable loop-mediated isothermal amplification (LAMP) PCR methods. *Water Res.* 2019;160:371-9. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.05.049>.
59. Niessen L, Gräfenhan T, Vogel RF. ATP citrate lyase 1 (*ac1*) gene-based loop-mediated amplification assay for the detection of the *Fusarium tricinctum* species complex in pure cultures and in cereal samples. *Int. J. Food Microbiol.* 2012;158(3):171-85. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.021>.
60. Ulrich S, Schäfer C. Toxin Production by *Stachybotrys chartarum* Genotype S on Different Culture Media. *J Fungi.* 2020;6(3):159. <https://doi.org/10.3390/jof6030159>.
61. Fakruddin M. Loop mediated isothermal amplification (LAMP)—an alternative to polymerase chain reaction (PCR). *Bangladesh Res Pub J.* 2011;5(4).
62. Parida M. Rapid and real-time detection technologies for emerging viruses of biomedical importance. *J Biosci* 2008;33(4):617-28.

## Tables and figures

Table 1: Oligonucleotides used as primers for LAMP reactions

Nucleotide name	Sequence 5' -> 3'	Melting temperature (°C)
FIP-SAT 14 ID8	TGTCACACAAGGTGCCCGTC-TCTCAAAGTCGAGCGAACTCC*	>75
BIP-SAT 14 ID8	GGTTGAGGTGCCCACTCTCAA-GAACGAATCCATGCCCGG*	>75
F3-SAT 14 ID8	GTTTTACAGACGCCCATCCA	57.3
B3-SAT 14 ID8	TCCCGTCCAATCCAGTCT	56.7
LF-SAT 14 ID8	CGCACCATTGTTGAGTCGG	59.4
LB-SAT 14 ID8	CAAGCCTGGTTGGTTGTATATGC	60.6
F2-SAT 14 ID8	TCTCAAAGTCGAGCGAACTCC	59.4
B2-SAT 14 ID8	GAACGAATCCATGCCCGG	58.2

\*Hyphenation indicates interface between F1c/B1 and F2/B2c parts of composit primer

**Table 2:** Strains of *S. chartarum* (n = 75) with *sat*-genotype and result in the genotyp S-specific LAMP reaction

Genus	Species	Strain ID	Source	<i>sat</i> -genotype <sup>1</sup>	LAMP-result <sup>2</sup>
<i>Stachybotrys</i>	<i>chartarum</i>	S 1352	LMU <sup>3</sup>	S	+ <sup>4</sup>
	<i>chartarum</i>	S 1344	LMU	n.r. <sup>5</sup>	+
	<i>chartarum</i>	S 1349	LMU	S	+
	<i>chartarum</i>	S 1418/1	LMU	S	+
	<i>chartarum</i>	S BB2	LMU	S	+
	<i>chartarum</i>	S BO1a	LMU	S	+
	<i>chartarum</i>	R07	LMU	S	+
	<i>chartarum</i>	R06	LMU	S	+
	<i>chartarum</i>	S 1425	LMU	S	+
	<i>chartarum</i>	S BT3	LMU	S	+
	<i>chartarum</i>	S BO2	LMU	S	+
	<i>chartarum</i>	S BO1b	LMU	S	+
	<i>chartarum</i>	CBS <sup>6</sup> 414.95	TUM <sup>7</sup>	S	+
	<i>chartarum</i>	R 24	LMU	S	+
	<i>chartarum</i>	S 1114	LMU	S	+
	<i>chartarum</i>	S 1493/1	LMU	S	+
	<i>chartarum</i>	S 1166/2	LMU	S	+
	<i>chartarum</i>	S 1455	LMU	S	+
	<i>chartarum</i>	S 1492	LMU	S	+
	<i>chartarum</i>	S 4	LMU	S	+
	<i>chartarum</i>	S 5	LMU	S	+
	<i>chartarum</i>	S 9	LMU	S	+
	<i>chartarum</i>	S 16St	LMU	S	+
	<i>chartarum</i>	S 23St	LMU	S	+
	<i>chartarum</i>	S 35It	LMU	S	+
	<i>chartarum</i>	S 48St	LMU	S	+
	<i>chartarum</i>	H 47A	LMU	S	+
	<i>chartarum</i>	H 47D	LMU	S	+
	<i>chartarum</i>	IBT <sup>8</sup> 7709	IBT	S	+
	<i>chartarum</i>	TMW_4.689	TUM	S	+
	<i>chartarum</i>	IBT 8935	IBT	n.r.	+
	<i>chartarum</i>	Sp 2675	TUM	S	+
	<i>chartarum</i>	S 1433	LMU	A	- <sup>9</sup>
	<i>chartarum</i>	S 1432	LMU	A	-
	<i>chartarum</i>	S 1431	LMU	A	-
	<i>chartarum</i>	S 1409	LMU	A	-
	<i>chartarum</i>	S 1378	LMU	A	-
	<i>chartarum</i>	S 1362	LMU	A	-
	<i>chartarum</i>	S 1353	LMU	A	-
	<i>chartarum</i>	S 1432	LMU	A	-
	<i>chartarum</i>	S 1074	LMU	A	-
	<i>chartarum</i>	S 1286	LMU	A	-
	<i>chartarum</i>	S 1387	LMU	A	-
	<i>chartarum</i>	S 1362	LMU	A	-
	<i>chartarum</i>	S 1091	LMU	A	-
	<i>chartarum</i>	S 1494	LMU	A	-



Table 2 continued

Genus	Species	Strain ID	Source	<i>sat</i> -genotype <sup>1</sup>	LAMP-result <sup>2</sup>
<i>Stachybotrys</i>	<i>chartarum</i>	S 24It/B	LMU	A	-
	<i>chartarum</i>	IBT 8709	IBT	A	-
	<i>chartarum</i>	TMW_4.685	TUM	A	-
	<i>chartarum</i>	TMW_4.674	TUM	A	-
	<i>chartarum</i>	S 1433	LMU	A	-
	<i>chartarum</i>	CBS 129.13	TUM	A	-
	<i>chartarum</i>	S 1244	LMU	A	-
	<i>chartarum</i>	TMW_4.675	TUM	A	-
	<i>chartarum</i>	S 1589	LMU	A	-
	<i>chartarum</i>	TMW_4.678	TUM	A	-
	<i>chartarum</i>	TMW_4.680	TUM	A	-
	<i>chartarum</i>	TMW_4.682	TUM	A	-
	<i>chartarum</i>	TMW_4.684	TUM	A	-
	<i>chartarum</i>	R10	LMU	A	-
	<i>chartarum</i>	R09	LMU	A	-
	<i>chartarum</i>	S6OW	LMU	H	-
	<i>chartarum</i>	S 1285	LMU	H	-
	<i>chartarum</i>	S 41	LMU	H	-
	<i>chartarum</i>	S 42	LMU	H	-
	<i>chartarum</i>	S 43	LMU	H	-
	<i>chartarum</i>	S 1341	LMU	H	-
	<i>chartarum</i>	S 1342	LMU	H	-
	<i>chartarum</i>	S 1335	LMU	H	-
	<i>chartarum</i>	S 3	LMU	H	-
	<i>chartarum</i>	CBS 324.65	TUM	H	-
	<i>chartarum</i>	S 1077	LMU	H	-
	<i>chartarum</i>	S 1333	LMU	H	-
	<i>chartarum</i>	S 1334	LMU	H	-
	<i>chartarum</i>	S 1339	LMU	H	-

<sup>1</sup>according to Ulrich et al. [34]<sup>2</sup>according to the current study<sup>3</sup>strain collection at Chair of Food Safety, Ludwig-Maximilian-University, Munich, Germany<sup>4</sup>positive result<sup>5</sup>no result<sup>6</sup>CBS strain collection at Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, The Netherlands<sup>7</sup>Chair of Technical Microbiology, School of Life Sciences Weihenstephan, Technical University of Munich, Germany<sup>8</sup>Culture Collection of Fungi, Danish Technical University, Lyngby, Denmark<sup>9</sup>negative result

**Table 3:** Comparison of selected isolates with data on macrocyclic trichothecene production as determined by LC-MS/MS and result in the genotype S specific LAMP reaction

Genus	Species	Strain ID	Source	<i>sat</i> - genotype <sup>1</sup>	LAMP- result <sup>2</sup>	Toxin production (LC-MS/MS) <sup>3</sup>
<i>Memnoniella</i>	<i>echinata</i>	MYA 584	LMU <sup>4</sup>	n.a. <sup>5</sup>	- <sup>6</sup>	n.d. <sup>7</sup>
<i>Stachybotrys</i>	<i>chartarum</i>	S BB2	LMU	S	+ <sup>8</sup>	+
	<i>chartarum</i>	S BO1a	LMU	S	+	+
	<i>chartarum</i>	S BT3	LMU	S	+	+
	<i>chartarum</i>	S BO2	LMU	S	+	+
	<i>chartarum</i>	S BO1b	LMU	S	+	+
	<i>chartarum</i>	S 1114	LMU	S	+	+
	<i>chartarum</i>	S 16St	LMU	S	+	+
	<i>chartarum</i>	S 35It	LMU	S	+	+
	<i>chartarum</i>	H 47D	LMU	S	+	+
	<i>chartarum</i>	S 1166/2	LMU	S	+	+
	<i>chartarum</i>	S 1455	LMU	S	+	+
	<i>chartarum</i>	S 1492	LMU	S	+	+
	<i>chartarum</i>	S 5	LMU	S	+	+
	<i>chartarum</i>	S 23St	LMU	S	+	+
	<i>chartarum</i>	H 47A	LMU	S	+	+
	<i>chartarum</i>	S 4	LMU	S	+	+
	<i>chartarum</i>	S 9	LMU	S	+	+
	<i>chartarum</i>	S 48St	LMU	S	+	+
	<i>chartarum</i>	S 1493/1	LMU	S	+	+
	<i>chartarum</i>	CBS <sup>9</sup> 414.95	TUM <sup>10</sup>	S	+	+
	<i>chartarum</i>	Sp 2675	TUM	S	+	+
	<i>chartarum</i>	R 24	LMU	S	+	+
	<i>chartarum</i>	CBS 129.13	TUM	A	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	S 1244	LMU	A	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	S 1074	LMU	A	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	S 1286	LMU	A	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	S 1091	LMU	A	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	S 1494	LMU	A	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	S 24It/B	LMU	A	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	S 1589	LMU	A	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	S 1378	LMU	A	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	S 1353	LMU	A	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	S 1432	LMU	A	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	S 1362	LMU	A	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	S 1433	LMU	A	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	S 1431	LMU	A	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	S 1285	LMU	H	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	S 1341	LMU	H	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	S 1342	LMU	H	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	S 1335	LMU	H	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	S 3	LMU	H	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	CBS 324.65	TUM	H	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	S 1339	LMU	H	-	n.d.

Table 3 continued

Genus	Species	Strain ID	Source	sat-genotype <sup>1</sup>	LAMP-result <sup>2</sup>	Toxin production (LC-MS/MS) <sup>3</sup>
<i>Stachybotrys</i>	<i>albipes</i> *	ATCC <sup>11</sup> 18873	ATCC	n.a.	-	n.d.
	<i>chlorohalonata</i>	IBT <sup>12</sup> 40285	IBT	n.a.	-	n.d.
	<i>cylindrospora</i>	ATCC 16276	ATCC	n.a.	-	n.d.
	<i>dichroa</i>	ATCC 18913	ATCC	n.a.	-	+
	<i>kampalensis</i>	ATCC 22705	ATCC	n.a.	-	n.d.
	<i>oenanthes</i>	ATCC 22844	ATCC	n.a.	-	n.d.

\*Anamorphic state of *Melanopsamma pomiformis*

<sup>1</sup>according to Ulrich et al. [34]

<sup>2</sup>according to the current study

<sup>3</sup>detection of macrocyclic trichothecenes according to [24, 34, 45, 46]

<sup>4</sup>strain collection at Chair of Food Safety, Ludwig-Maximilian-University, Munich, Germany

<sup>5</sup>not applicable

<sup>6</sup>negative result

<sup>7</sup>no macrocyclic trichothecenes (satratoxin G, H, and F; roridine E and L-2; verrucarins J) detected by LC-MS/MS (LOD 0.1 – 7.8 ng/g MEA agar)

<sup>8</sup>positive result in LAMP/macrocylic trichothecenes detected by LC-MS/MS

<sup>9</sup>CBS strain collection at Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, The Netherlands

<sup>10</sup>Chair of Technical Microbiology, School of Life Sciences Weihenstephan, Technical University of Munich, Germany

<sup>11</sup>ATCC American Type Culture Collection, Manassas, USA

<sup>12</sup>Culture Collection of Fungi, Danish Technical University, Lyngby, Denmark

**Table S1:** List of fungal species and strains (n = 227) used in the current study with result obtained with the newly developed LAMP assay.

Genus	Species	Strain ID	Source	sat- geno- type <sup>1</sup>	LAMP- result <sup>2</sup>	Toxin production (LC-MS/ MS) <sup>3</sup>
<i>Alternaria</i>	<i>alternata</i>	TMW 4.0438	TUM <sup>4</sup>	n.a. <sup>5</sup>	- <sup>6</sup>	n.a.
	<i>mali</i>	CBS 106.24	CBS <sup>7</sup>	n.a.	-	n.a.
<i>Aspergillus</i>	<i>aculeatus</i>	TMW 4.1776	TUM	n.a.	-	n.a.
	<i>alliaceus</i>	DSM 813	DSM <sup>8</sup>	n.a.	-	n.a.
	<i>arachidicola</i>	IBT 27128	IBT <sup>9</sup>	n.a.	-	n.a.
	<i>auricomus</i>	CBS 467.65	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>awamori</i>	CBS 101704	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>bombycis</i>	IBT 23536	IBT	n.a.	-	n.a.
	<i>bridgeri</i>	CBS 350.81	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>caelatus</i>	IBT 29700	IBT	n.a.	-	n.a.
	<i>carbonarius</i>	TMW 4.1512	TUM	n.a.	-	n.a.
	<i>clavatus</i>	CBS 513.65	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>elegans</i>	CBS 310.80	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>ellipticus</i>	CBS 707.79	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>flavus</i>	TMW 4.1859	TUM	n.a.	-	n.a.
	<i>foetidus</i>	CBS114.49	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>fresenii</i>	CBS 550.65	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>fumigatus</i>	CBS 113.55	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>helicothrix</i>	CBS 677.79	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>heteromorphus</i>	CBS 117.55	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>insulicola</i>	CBS 382.75	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>japonicus</i>	CBS 114.51	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>minisclerotigenes</i>	IBT 27177	IBT	n.a.	-	n.a.
	<i>niger</i>	CBS 101698	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>nomius</i>	CBS 260.88	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>ochraceoroseus</i>	CBS 101887	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>ochraceus</i>	CBS 263.67	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>oryzae</i>	IBT 28103	IBT	n.a.	-	n.a.
	<i>parasiticus</i>	CBS 126.62	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>parvisclerotigene</i>	IBT 3850	IBT	n.a.	-	n.a.
	<i>petrakii</i>	CBS 105.57	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>pseudotararii</i>	IBT 21092	IBT	n.a.	-	n.a.
	<i>rambellii</i>	IBT 14580	IBT	n.a.	-	n.a.
	<i>sclerotiorum</i>	CBS 549.65	CBS	n.a.	-	n.a.
<i>sojae</i>	IBT 21643	IBT	n.a.	-	n.a.	
<i>tamarii</i>	CBS 591.68	CBS	n.a.	-	n.a.	
<i>terreus</i>	CBS 377.64	CBS	n.a.	-	n.a.	
<i>toxicarius</i>	CBS 822.72	CBS	n.a.	-	n.a.	
<i>tubingensis</i>	ITEM 4496	ITEM <sup>10</sup>	n.a.	-	n.a.	
<i>usamii</i>	CBS 101700	CBS	n.a.	-	n.a.	
<i>Aureobasidium</i>	<i>pullulans</i>	TMW 4.2253	TUM	n.a.	-	n.a.
<i>Beltraniella</i>	<i>portoricensis</i>	CBS 856.70	CBS	n.a.	-	n.a.
<i>Bipolaris</i>	<i>sorokiniana</i>	CBS 311.64	CBS	n.a.	-	n.a.

Table S1 continued

Genus	Species	Strain ID	Source	sat- geno- type <sup>1</sup>	LAMP- result <sup>2</sup>	Toxin production (LC-MS/ MS) <sup>3</sup>
<i>Cladobotryum</i>	<i>dendroides</i>	NRRL 2903	NRRL <sup>11</sup>	n.a.	-	n.a.
<i>Cladosporium</i>	<i>sphaerospermum</i>	TMW 4.2370	TUM	n.a.	-	n.a.
<i>Colletotrichum</i>	<i>acutatum</i>	CBS 295.67	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>fragariae</i>	CBS 142.31	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>gloeosporioides</i>	CBS 285.50	CBS	n.a.	-	n.a.
<i>Cryptomela</i>	<i>acutispora</i>	CBS 157.33	CBS	n.a.	-	n.a.
<i>Drechslera</i>	<i>teres</i>	CBS 378.59	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>tricici-repentis</i>	CBS 265.80	CBS	n.a.	-	n.a.
<i>Emericella</i>	<i>astellata</i>	IBT 21903	IBT	n.a.	-	n.a.
	<i>olivicola</i>	IBT 26499	IBT	n.a.	-	n.a.
	<i>venezuelensis</i>	IBT 20956	IBT	n.a.	-	n.a.
<i>Epicoccum</i>	<i>nigrum</i>	TMW 4.1407	TUM	n.a.	-	n.a.
<i>Fusarium</i>	<i>acuminatum</i>	CBS 485.94	VBS	n.a.	-	n.a.
	<i>avenaceum</i>	DSM 62161	DSM	n.a.	-	n.a.
	<i>beomiforme</i>	BBA 69406	BBA <sup>12</sup>	n.a.	-	n.a.
	<i>cerealis</i>	CBS 589.93	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>chlamydosporum</i>	CBS 145.25	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>compactum</i>	CBS 466.92	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>culmorum</i>	DSM 62191	DSM	n.a.	-	n.a.
	<i>dimerum</i>	CBS 175.31	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>dlaminii</i>	MRC 3024	MRC <sup>13</sup>	n.a.	-	n.a.
	<i>equiseti</i>	CBS 406.86	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>eumartii</i>	DSM 62809	DSM	n.a.	-	n.a.
	<i>heterosporum</i>	DSM 62231	DSM	n.a.	-	n.a.
	<i>longipes</i>	CBS 739.79	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>melanochlorum</i>	CBS 202.65	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>napiforme</i>	BBA 67629	BBA	n.a.	-	n.a.
	<i>oxysporum</i>	DSM 62292	DSM	n.a.	-	n.a.
	<i>proliferatum</i>	DSM 62261	DSM	n.a.	-	n.a.
	<i>scirpi</i>	CBS 448.84	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>solani</i>	DSM 62416	DSM	n.a.	-	n.a.
	<i>subglutinans</i>	BBA 63621	BBA	n.a.	-	n.a.
	<i>sublunatum</i> var.	CBS 189.34	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>torulosum</i>	BBA 64465	BBA	n.a.	-	n.a.
	<i>Geomyces</i>	<i>auratus</i>	BBA 66636	BBA	n.a.	-
<i>Geotrichum</i>	<i>candidum</i>	TMW 4.0508	TUM	n.a.	-	n.a.
<i>Gliocephalotrichum</i>	<i>spec. nov.</i>	NRRL 2993	NRRL	n.a.	-	n.a.
<i>Hypomyces</i>	<i>rosellus</i>	CBS 521.81	CBS	n.a.	-	n.a.
<i>Memnoniella</i>	<i>echinata</i>	CBS 627.61	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>echinata</i>	MYA 584	LMU	n.a.	-	n.d.
<i>Microdochium</i>	<i>majus</i>	TMW 4.0496	TUM	n.a.	-	n.a.
	<i>nivale</i>	TMW 4.0495	TUM	n.a.	-	n.a.
<i>Monascus</i>	<i>ruber</i>	TMW 4.1426	TUM	n.a.	-	n.a.
<i>Mucor</i>	<i>mucedo</i>	DSM 809	DSM	n.a.	-	n.a.

Table S1 continued

Genus	Species	Strain ID	Source	sat- geno- type <sup>1</sup>	LAMP- result <sup>2</sup>	Toxin production (LC-MS/ MS) <sup>3</sup>
<i>Myrothecium</i>	<i>roridum</i>	CBS 331.51	CBS	n.a.	-	n.a.
<i>Penicillium</i>	<i>aurantiogriseum</i>	CBS 225.90	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>brevicompactum</i>	TMW 4.2279	TUM	n.a.	-	n.a.
	<i>camembertii</i>	DSM 1233	DSM	n.a.	-	n.a.
	<i>chrysogenum</i>	CBS 573.68	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>commune</i>	CBS 311.48	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>corylophilum</i>	CBS 321.48	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>crustosum</i>	CBS 499.73	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>digitatum</i>	DSM 62840	DSM	n.a.	-	n.a.
	<i>expansum</i>	DSM 62841	DSM	n.a.	-	n.a.
	<i>glabrum</i>	TMW 4.2027	TUM	n.a.	-	n.a.
	<i>griseofulvum</i>	TMW4.1543	TUM	n.a.	-	n.a.
	<i>italicum</i>	DSM 62846	DSM	n.a.	-	n.a.
	<i>janthinellum</i>	TMW 4.2318	TUM	n.a.	-	n.a.
	<i>jensenii</i>	TMW 4.2316	TUM	n.a.	-	n.a.
	<i>nalgiovense</i>	TMW 4.1371	TUM	n.a.	-	n.a.
	<i>nordicum</i>	BFE 487	TUM	n.a.	-	n.a.
	<i>olsonii</i>	TMW 4.1362	TUM	n.a.	-	n.a.
	<i>purpurescens</i>	CBS 223.28	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>purpurogenum</i>	CBS 286.36	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>roqueforti</i>	CBS 221.30	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>roseopurpureum</i>	TMW 4.1770	TUM	n.a.	-	n.a.
	<i>rugulosum</i>	TMW 4.1902	TUM	n.a.	-	n.a.
	<i>stoloniferum</i>	TMW 4.2280	TUM	n.a.	-	n.a.
	<i>variabile</i>	CBS 385.48	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>verrucosum</i>	CBS 603.74	CBS	n.a.	-	n.a.
	<i>waksmanii</i>	TMW 4.2317	TUM	n.a.	-	n.a.
<i>Pseudogymnoascus</i>	<i>destructans</i>	OT-38-2010	OT <sup>14</sup>	n.a.	-	n.a.
	<i>pannorum</i>	BBA 66108	BBA	n.a.	-	n.a.
<i>Scopulariopsis</i>	<i>acremonioides</i>	TMW 4.2366	TUM	n.a.	-	n.a.
<i>Stachybotrys</i>	<i>albipes*</i>	ATCC 18873	ATCC <sup>15</sup>	n.a.	-	n.d. <sup>16</sup>
	<i>bisbyi</i>	ATCC 22173	ATCC	n.a.	-	n.a.
	<i>chartarum</i>	S 1352	LMU <sup>17</sup>	S	+ <sup>18</sup>	n.a.
	<i>chartarum</i>	S 1344	LMU	n.r. <sup>19</sup>	+	n.a.
	<i>chartarum</i>	S 1349	LMU	S	+	n.a.
	<i>chartarum</i>	S 1418/1	LMU	S	+	n.a.
	<i>chartarum</i>	S BB2	LMU	S	+	+
	<i>chartarum</i>	S BO1a	LMU	S	+	+
	<i>chartarum</i>	S 1433	LMU	A	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	S 1432	LMU	A	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	S 1431	LMU	A	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	S 1409	LMU	A	-	n.a.
	<i>chartarum</i>	S 1378	LMU	A	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	S 1362	LMU	A	-	n.a.

Table S1 continued

Genus	Species	Strain ID	Source	<i>sat</i> - geno- type <sup>1</sup>	LAMP- result <sup>2</sup>	Toxin production (LC-MS/ MS) <sup>3</sup>
<i>Stachybotrys</i>	<i>chartarum</i>	S 1425	LMU	S	+	n.a.
	<i>chartarum</i>	S BT3	LMU	S	+	+
	<i>chartarum</i>	S BO2	LMU	S	+	+
	<i>chartarum</i>	S BO1b	LMU	S	+	+
	<i>chartarum</i>	CBS 324.65	TUM	H	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	CBS 414.95	TUM	S	+	+
	<i>chartarum</i>	CBS 129.13	TUM	A	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	S 1244	LMU	A	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	R 24	LMU	S	+	+
	<i>chartarum</i>	S 1433	LMU	A	-	n.a.
	<i>chartarum</i>	S 1114	LMU	S	+	+
	<i>chartarum</i>	S60W	LMU	H	-	n.a.
	<i>chartarum</i>	S 1432	LMU	A	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	S 1074	LMU	A	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	S 1286	LMU	A	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	S 41	LMU	H	-	n.a.
	<i>chartarum</i>	S 42	LMU	H	-	n.a.
	<i>chartarum</i>	S 43	LMU	H	-	n.a.
	<i>chartarum</i>	S 1493/1	LMU	S	+	+
	<i>chartarum</i>	S 1353	LMU	A	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	S 1341	LMU	H	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	S 1387	LMU	A	-	n.a.
	<i>chartarum</i>	S 1342	LMU	H	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	S 1362	LMU	A	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	S 1335	LMU	H	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	S 1091	LMU	A	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	S 1166/2	LMU	S	+	+
	<i>chartarum</i>	S 1285	LMU	H	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	S 1455	LMU	S	+	+
	<i>chartarum</i>	S 1492	LMU	S	+	+
	<i>chartarum</i>	S 1494	LMU	A	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	S 1589	LMU	A	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	S 3	LMU	H	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	S 4	LMU	S	+	+
	<i>chartarum</i>	S 5	LMU	S	+	+
	<i>chartarum</i>	S 9	LMU	S	+	+
	<i>chartarum</i>	S 16St	LMU	S	+	+
	<i>chartarum</i>	S 23St	LMU	S	+	+
	<i>chartarum</i>	S 24It/B	LMU	A	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	S 35It	LMU	S	+	+
	<i>chartarum</i>	S 48St	LMU	S	+	+
	<i>chartarum</i>	H 47A	LMU	S	+	+
	<i>chartarum</i>	H 47D	LMU	S	+	+
	<i>chartarum</i>	IBT 7709	IBT	S	+	n.a.

Table S1 continued

Genus	Species	Strain ID	Source	sat- geno- type <sup>1</sup>	LAMP- result <sup>2</sup>	Toxin production (LC-MS/ MS) <sup>3</sup>
<i>Stachybotrys</i>	<i>chartarum</i>	IBT 8709	IBT	A	-	n.a.
	<i>chartarum</i>	IBT 8935	IBT	n.r.	+	n.a.
	<i>chartarum</i>	Sp 2675	TUM	S	+	+
	<i>chartarum</i>	TMW_4.685	TUM	A	-	n.a.
	<i>chartarum</i>	TMW_4.674	TUM	A	-	n.a.
	<i>chartarum</i>	TMW_4.689	TUM	S	+	n.a.
	<i>chartarum</i>	TMW_4.675	TUM	A	-	n.a.
	<i>chartarum</i>	TMW_4.678	TUM	A	-	n.a.
	<i>chartarum</i>	TMW_4.680	TUM	A	-	n.a.
	<i>chartarum</i>	TMW_4.682	TUM	A	-	n.a.
	<i>chartarum</i>	TMW_4.684	TUM	A	-	n.a.
	<i>chartarum</i>	S 1077	LMU	H	-	n.a.
	<i>chartarum</i>	S 1333	LMU	H	-	n.a.
	<i>chartarum</i>	S 1334	LMU	H	-	n.a.
	<i>chartarum</i>	S 1339	LMU	H	-	n.d.
	<i>chartarum</i>	R10	LMU	A	-	n.a.
	<i>chartarum</i>	R09	LMU	A	-	n.a.
	<i>chartarum</i>	R07	LMU	S	+	n.a.
	<i>chartarum</i>	R06	LMU	S	+	n.a.
	<i>chlorohalonata</i>	S 48	LMU	n.a.	-	n.a.
	<i>chlorohalonata</i>	TMW_4.683	TUM	n.a.	-	n.a.
	<i>chlorohalonata</i>	TMW_4.676	TUM	n.a.	-	n.a.
	<i>chlorohalonata</i>	TMW_4.677	TUM	n.a.	-	n.a.
	<i>chlorohalonata</i>	TMW_4.688	TUM	n.a.	-	n.a.
	<i>chlorohalonata</i>	TMW_4.686	TUM	n.a.	-	n.a.
	<i>chlorohalonata</i>	TMW_4.672	TUM	n.a.	-	n.a.
	<i>chlorohalonata</i>	TMW_4.673	TUM	n.a.	-	n.a.
	<i>chlorohalonata</i>	IBT 40285	IBT	n.a.	-	n.d.
	<i>chlorohalonata</i>	H 47B	LMU	n.a.	-	n.a.
	<i>chlorohalonata</i>	H 47C	LMU	n.a.	-	n.a.
	<i>chlorohalonata</i>	H 42St	LMU	n.a.	-	n.a.
	<i>chlorohalonata</i>	S 44St	LMU	n.a.	-	n.a.
	<i>chlorohalonata</i>	S 24St/A	LMU	n.a.	-	n.a.
	<i>chlorohalonata</i>	S S01	LMU	n.a.	-	n.a.
	<i>chlorohalonata</i>	S 7	LMU	n.a.	-	n.a.
	<i>chlorohalonata</i>	S 1166/1	LMU	n.a.	-	n.a.
	<i>chlorohalonata</i>	CBS 413.95	TUM	n.a.	-	n.a.
	<i>chlorohalonata</i>	R04	LMU	n.a.	-	n.a.
	<i>chlorohalonata</i>	SBM29	LMU	n.a.	-	n.a.
	<i>chlorohalonata</i>	R01	LMU	n.a.	-	n.a.
	<i>cylindrospora</i>	ATCC 16276	ATCC	n.a.	-	n.d.
	<i>dichroa</i>	ATCC 18913	ATCC	n.a.	-	+
	<i>elegans</i>	DSM 66760	DSM	n.a.	-	n.a.
	<i>kampalensis</i>	ATCC 22705	ATCC	n.a.	-	n.d.



Table S1 continued

Genus	Species	Strain ID	Source	sat- geno- type <sup>1</sup>	LAMP- result <sup>2</sup>	Toxin production (LC-MS/ MS) <sup>3</sup>
<i>Stachybotrys</i>	<i>microspore</i>	ATCC 18852	ATCC	n.a.	-	n.a.
	<i>oenanthes</i>	ATCC 22844	ATCC	n.a.	-	n.d.
<i>Trichoderma</i>	<i>harzianum</i>	TMW 4.1502	TUM	n.a.	-	n.a.
	<i>virens</i>	CBS 344.47	CBS	n.a.	-	n.a.
<i>Trichothecium</i>	<i>roseum</i>	CBS 567.50	CBS	n.a.	-	n.a.
<i>Zygosaccharomyce</i>	<i>bailii</i>	DSM 70834	DSM	n.a.	-	n.a.
	<i>bisporus</i>	TMW 3.062	TUM	n.a.	-	n.a.
	<i>rouxii</i>	DSM 2531	DSM	n.a.	-	n.a.

\*Anamorphic state of *Melanopsamma pomiformis*

<sup>1</sup>according to Ulrich et al. [34]

<sup>2</sup>according to the current study

<sup>3</sup>detection of macrocyclic trichothecenes according to [24, 34, 45, 46]

<sup>4</sup>Chair of Technical Microbiology, School of Life Sciences Weihenstephan, Technical University of Munich, Germany

<sup>5</sup>not applicable/not analysed

<sup>6</sup>negative result

<sup>7</sup>CBS strain collection at Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, The Netherlands

<sup>8</sup>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Darmstadt, DE

<sup>9</sup>Culture Collection of Fungi, Danish Technical University, Lyngby, Denmark

<sup>10</sup>Istituto Tossine e Micotossine da Parassiti Vegetali, CNR, Bari, IT

<sup>11</sup>Northern Regional Research Laboratory, Peoria (Illinois), USA

<sup>12</sup>Julius Kühn Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Berlin, DE

<sup>13</sup>South African Medical Research Council, Tygerberg, SA

<sup>14</sup>Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung, Berlin, Deutschland

<sup>15</sup>ATCC American Type Culture Collection, Manassas, USA

<sup>16</sup>not detected

<sup>17</sup>strain collection at Chair of Food Safety, Ludwig-Maximilian-University, Munich, Germany

<sup>18</sup>positive result

<sup>19</sup>no result

```

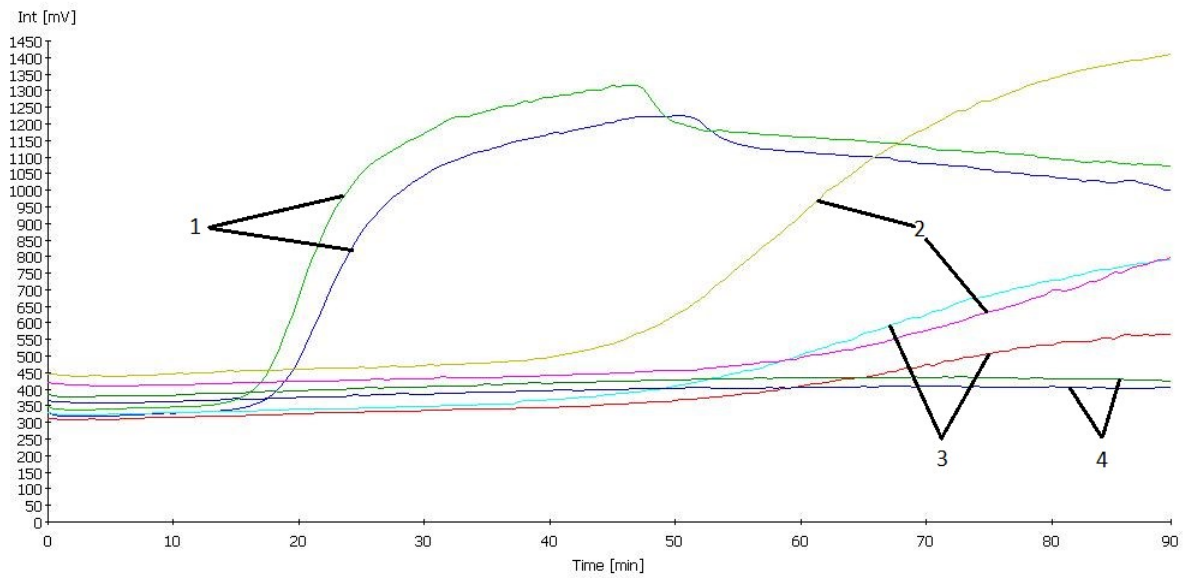
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          5          15          25          35          45          55
SAT 14  TCTCAAGTCG AGCGAACTCC CTCCCGACTC AAACAATGGT GCGTGGGCCC GCGCCCGACG
Consensus ----- ----AACTCC CTCCCGACTC AAACAATGGT GCGTGGGCCC GCGCCCGACG

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          65          75          85          95          105          115
SAT 14  GGCACCTTGT GTGACATTAT ACTGGGATGG GGTTGAGGTG CCCACTCTCA AACAAAGCCTG
Consensus GGCACCTTGT GTGACATTAT ACTGGGATGG GGTTGAGGTG CCCACTCTCA AACAAAGCCTG

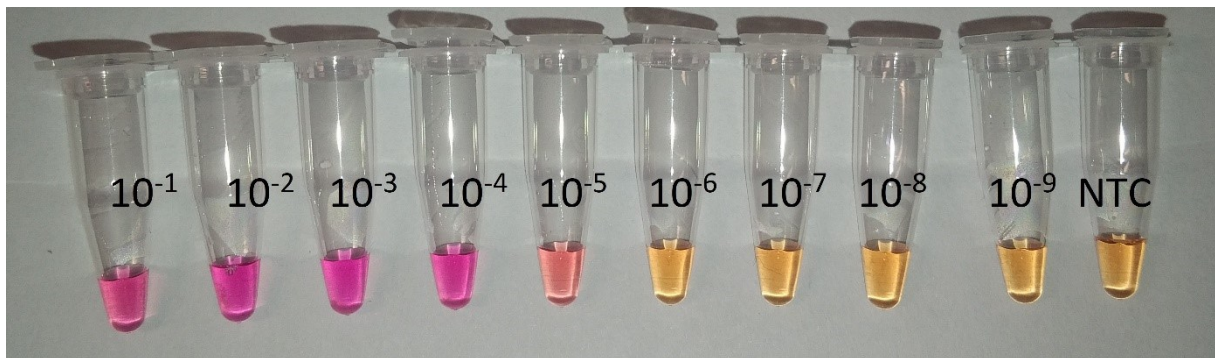
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....
          125          135          145          155          165
SAT 14  GTTGGTTGTA TATGCATTCT TCACAATGAG GCCGGGCATG GATTCGTTCA GACT
Consensus GTTGGTTGTA TATGCATTCT TCACAATGAG GCCGGGCATG -----

```

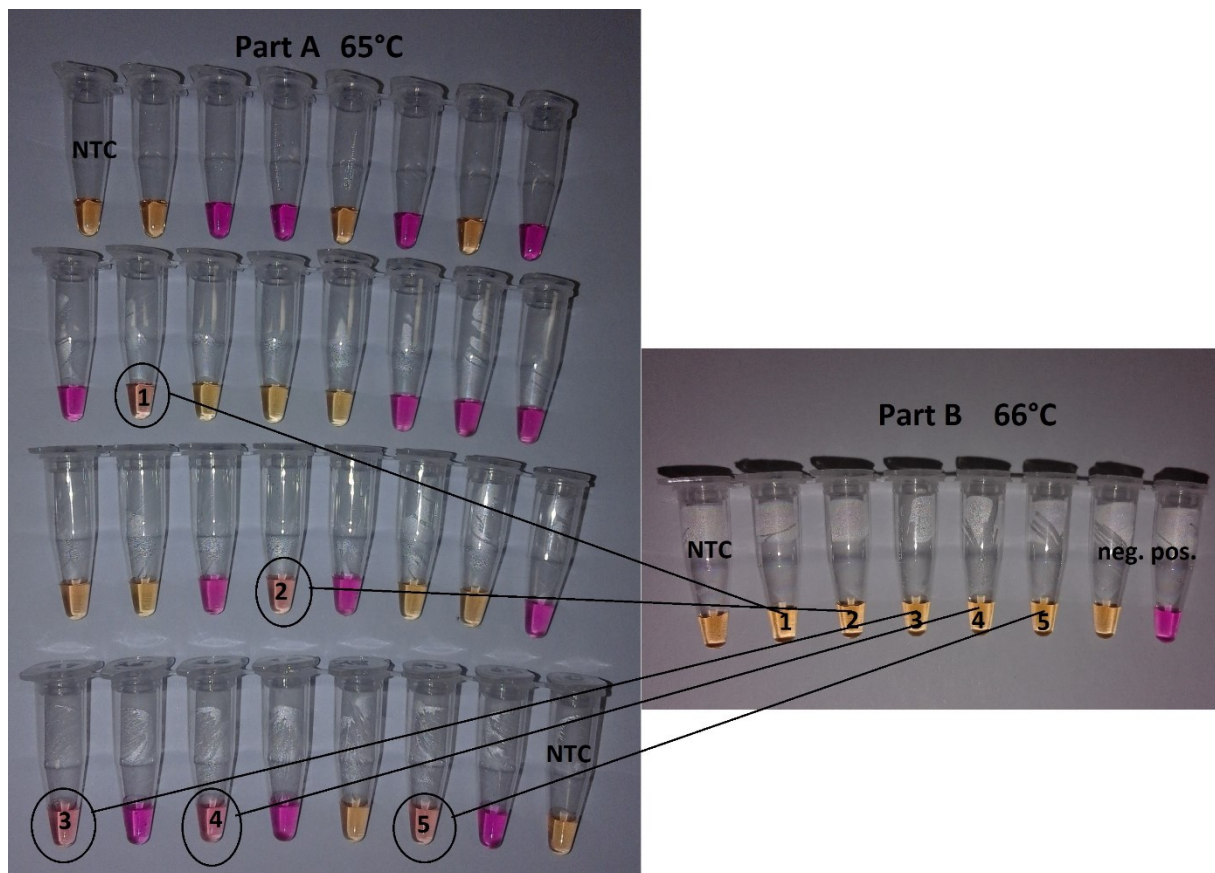
**Fig. 1** Comparison of the *sat14* gene partial sequence with a consensus sequence of the PCR product obtained with primers F2/B2 on the smallest DNA fragment produced during reactions with the *sat14* gene specific LAMP assay



**Fig. 2** Influence of loop primers on reaction speed of the *sat14* gene specific LAMP reaction using V13 as fluorescent indicator. Graph-pair 1: Both LF + LB loop primers added to the reaction. Graph-pair 2: only LB primer added to the reaction. Graph-pair 3: only LF primer added to the reaction. Graph-pair 4: no loop primers added to the reaction

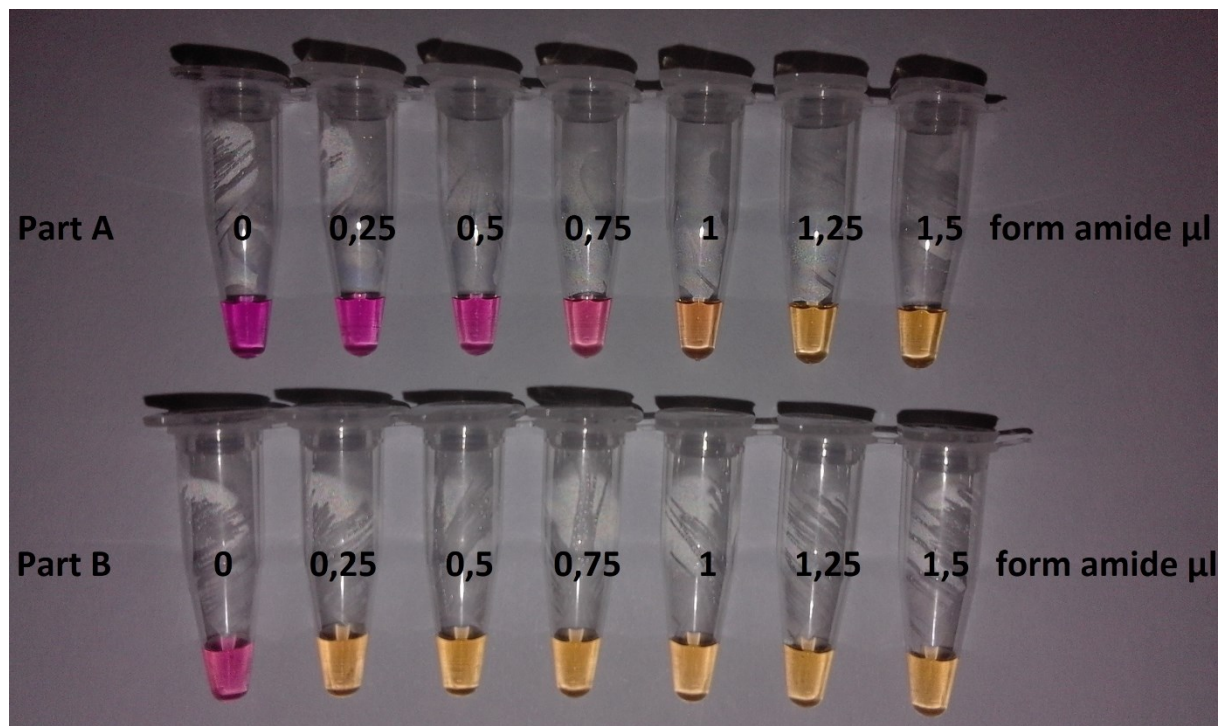


**Fig. 3** *Sat14* gene specific LAMP reaction with a serial dilution of gDNA of reference strain CBS 414.95 using neutral red as pH sensitive indicator (positive reaction indicated by color change from yellow to purple). Cap with  $10^{-1}$  holds  $1.27 \text{ ng}/\mu\text{l}$  (equivalent to  $6.35 \text{ pg}$  per reaction) as initial template DNA concentration, NTC = No template control



**Figure S1:** Influence of incubation temperature on the specificity of the LAMP reaction. A: LAMP reactions with DNA of *S. chartarum* genotypes S, A and H as well as *S. chlorohalonata* at 65°C for one hour. Pink reaction vessels contain DNA from *S. chartarum* genotype S as template. Yellow coloured vessels contain DNA from other genotypes and show a negative result. Reactions marked 1-5 are false positives (1: *S. chartarum* genotype A, 2: *S. chartarum* genotype H, 3: *S. chlorohalonata*, 4: *S. chlorohalonata*, 5: *S. chlorohalonata*). NTC: No template control.

B: LAMP reactions with template DNA used in reactions marked 1-5 after one hour of incubation at 66 °C. Note that the reactions are clearly negative under the optimized conditions. Neg.: negative control *S. chartarum* genotype A, pos.: positive control *S. chartarum* genotype S, NTC: No template control.



**Figure S2:** Influence of formamide on the specificity of the LAMP reaction. A: LAMP reactions with DNA from *S. chartarum* genotype S as template and addition of 0.0 to 1.5  $\mu$ L formamide per reaction. Note that addition of 0.75  $\mu$ L per reaction still results in a positive LAMP reaction within one hour of incubation. Higher amounts of formamide inhibit the reaction. B: LAMP reaction with DNA from *S. chlorohalonata* as template and addition of 0.0 to 1.5  $\mu$ L formamide per reaction. Note that the reaction was positive with 0.0  $\mu$ L formamide per reaction. Addition of 0.25 to 1.5  $\mu$ L per reaction lead to complete inhibition of the LAMP reaction.

## 4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Chemotyp S von *S. chartarum* mithilfe der LAMP-Methode anhand isolierter genomischer DNA, sicher nachzuweisen. Es wurde dazu gDNA von 227 Pilzisolaten getestet, wobei alle 30 *S. chartarum* Stämme des Chemotyps S erfolgreich durch ein positives Signal detektiert werden konnten.

Hinsichtlich etwaiger Kreuzreaktionen mit Stämmen der Chemotypen A und Genotyp H von *S. chartarum* und dem nah verwandten *S. chlorhalonata* sowie DNA aus Pilzen anderer Gattungen konnte der LAMP-Ansatz soweit verbessert und modifiziert werden, dass keine falsch positiven Reaktionen unter den getesteten Isolaten auftraten. Bei DNA-Proben von *Penicillium janthinellum*, *Penicillium olsonii* sowie von *Fusarium equiseti* ergaben sich jedoch zunächst auch unter den optimierten Reaktionsbedingungen positive Reaktionen im LAMP-Assay. Eine Neuanzucht mit anschließender DNA-Extraktion und nochmaliger Testung lieferte jedoch bei erneuter Überprüfung in allen Fällen negative Ergebnisse. Eine Messung etwaiger Gehalte an makrozyklischen Trichothecenen in den betreffenden Kulturen mithilfe von LC-MS/MS führte ebenfalls zu negativen Ergebnissen. Aus diesen Resultaten kann geschlossen werden, dass die ursprünglich verwendete und über einen längeren Zeitraum gelagerte DNA dieser drei Pilzarten möglicherweise während des Umgangs im Labor mit Spuren der DNA von *S. chartarum* Genotyp S verunreinigt wurde und deshalb zum Auftreten scheinbarer Kreuzreaktionen mit dem LAMP Assay führte.

Das Isolat *S. dichroa* ATCC 18913 wurde in früheren Arbeiten als Produzent der makrozyklischen Trichothecene Roridin E (Andersen et al., 2002) und Verrucarin J (Ulrich, 2016) beschrieben. Die Bildung von Satratoxinen wurden bei diesem Isolat jedoch nicht bestätigt. Da es sich bei dem in dieser Arbeit nachgewiesenen Abschnitt des *sat14* Gens um einen für die Biosynthese von Satratoxinen unabdingbaren Sequenzabschnitt in Satratoxin-bildenden *S. chartarum* Stämmen handelt (Semeiks et al., 2014), ist das negative Ergebnis im LAMP-Assay für diesen Stamm als korrekt anzusehen.

Aus Studien zur Zytotoxizität ist klar ersichtlich, dass makrozyklische Trichothecene *in vitro* eine um ein Vielfaches höhere Toxizität aufweisen als andere Mykotoxine (Gareis, 2006). Da der Micromyzet bevorzugt auf zellulosereichem Material wie Stroh wächst, sind Nachweise von makrozyklischen Trichothecenen in Einstreu- und Futtermaterial für Nutztiere nicht

ungewöhnlich (Drobotko, 1945; Harrach et al., 1983b). In der vorliegenden Arbeit konnte *S. chartarum* Chemotyp S mithilfe des LAMP-Assays aus DNA Proben sicher nachgewiesen werden. Die tatsächliche Präsenz von makrozyklischen Trichothecenen kann mithilfe der LC-MS/MS bestätigt werden (Gottschalk et al., 2006, 2008). Die Zytotoxizität wiederum wird über den MTT-Zellkulturtest eingeschätzt (Hanelt et al., 1994). LAMP kann diese Methoden nicht ersetzen, aber sinnvoll ergänzen, zumal eine Anwendung vor Ort nach weiterer Optimierung denkbar ist.

#### 4.1 Vergleich LAMP und PCR

Beim Nachweis des ubiquitär verbreiteten Parasiten *Toxoplasma gondii* in Blutproben von Mäusen konnte eine höhere Sensitivität von LAMP gegenüber der konventionellen PCR dargestellt werden (Fallahi et al., 2015). Die Nachweisgrenze lag mit der LAMP Methode bei 0,01 Tachyzoiten von *Toxoplasma gondii*, bei der PCR Methode hingegen bei 12 Tachyzoiten.

In einer Studie von Appelt et al. (2019), in der Milchproben auf *Mycoplasma bovis* untersucht wurden, zeigte sich der LAMP-Assay im Gegensatz zur qPCR anfälliger bei der Testung von unaufgereinigter DNA und wurde als kontaminationsanfällig beurteilt. Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zur Erkenntnis, dass sich LAMP-Assays robuster als PCR-Ansätze bei der Anwendung auf Proben ohne vorherigen Reinigungsprozess zeigen (Fakruddin, 2011; Niessen, 2015).

Eine Gegenüberstellung von qPCR und LAMP beim Nachweis des Erregers der Infektiösen Laryngotracheitis beim Geflügel (*Gallid herpesvirus 1*), ergab eine höhere Sensitivität der qPCR-Methode (10 Kopien/ $\mu$ l Probe, bei LAMP 60 Kopien/ $\mu$ l Probe), wobei die LAMP Methode mit geringerem Zeitaufwand (45 Minuten), Kosteneffizienz und geringerem Laboraufwand bewertet wurde (Ou et al., 2012).

Beim qualitativen Nachweis von Mykotoxin produzierenden Schimmelpilzen zeigt die LAMP-Methode eine um bis zu zehnfach erhöhte Sensitivität als konventionelle PCR-Methoden. Bei quantitativer Herangehensweise zeigt sich hingegen die qPCR präziser, da es sich im Gegensatz zur PCR bei der LAMP um einen kontinuierlichen Reaktionsprozess handelt (Niessen, 2018).

Der PCR Ansatz von Lewińska et al. (2016) zum Nachweis von *S. chartarum* und *Chaetomium* spp. basiert auf der Vervielfältigung des Gens für die Mitogen aktivierte Proteinkinase *hogA*



und dem Bandenmuster der anschließenden Gelelektrophorese. Eine Unterscheidung der Genotypen oder auch die Abgrenzung von *S. chartarum* gegenüber *S. chlorohalonata* ist mit der beschriebenen Methode nicht möglich. Im Gegensatz zur LAMP ist also ein Nachweis nicht möglich, ohne das Reaktionsröhrchen zu öffnen. Das Hantieren mit den hohen Mengen an Amplifikat nach der Reaktion stellen bei der PCR folglich ein Kontaminationsrisiko für das Labor dar. Hier bietet die LAMP den Vorteil eines Nachweises noch im Mikroreaktionsgefäß.

Bei Verwendung von Indikatoren wie Neutralrot, wie in der vorliegenden Arbeit, wird kein zusätzlicher apparativer Aufwand nötig (Denschlag et al., 2013), da der Farbumschlag mit bloßem Auge zu erkennen ist. Anders als Chemikalien wie Etidiumbromid, das bei der PCR zur Färbung des Gels in der Elektrophorese verwendet wird, ist Neutralrot ungiftig (Borenfreund und Puerner, 1985). Ein zusätzliches Labor mit Ausrüstung für Gelelektrophorese wird für die Ergebnisauswertung nicht benötigt (Fakruddin, 2011).

## 4.2 Zukünftige Anwendbarkeit in der Diagnostik

Für Anwendungen von LAMP direkt vor Ort ist diese Nukleinsäureamplifikationstechnik potenziell sehr gut geeignet, da keine spezielle apparative Ausstattung zum Erhitzen (es reicht ein Wasserbad) benötigt wird und sich der zeitliche Rahmen im Bereich von 60 Minuten befindet. Der Applikation im Felde kommt außerdem der einfache Nachweis mithilfe von Indikatoren wie Neutralrot zugute.

Der direkte Nachweis von Pilzmaterial gelang bereits in verschiedenen Studien (Denschlag et al., 2012; Luo et al., 2014; Niessen et al., 2012; Niessen und Vogel, 2010). Akkubetriebene Echtzeit-Fluoreszenz-Messgeräte wie das in der vorliegenden Arbeit verwendete ESEquant TS (QIAGEN Lake Constance GmbH, Stockach, Deutschland) ermöglichen den direkten Vor-Ort-Einsatz eines LAMP-Assays.

Die lokale Anwendung eines LAMP-Assays wird durch die Notwendigkeit einer intakten Kühlkette der Reagenzien (besonders der Polymerase) deutlich eingeschränkt. Es besteht aber auch die Möglichkeit einer Trocknung der Reagenzien im Mikroreaktionsgefäß mit anschließender Resuspension des Lyophilisates um eine Reaktion ablaufen zu lassen. Als Beispiel ist hier die Studie von Hayashida et al. (2015) zu nennen, in der die Erreger der Humanen Afrikanischen Trypanosomiasis *Trypanosoma brucei rhodiense* und *Trypanosoma brucei gambiense*

in Vollblutproben nachgewiesen wurden. In dieser Arbeit konnte auch nach siebenmonatiger Lagerung bei 40°C kein signifikanter Abfall der Sensitivität des Testes beobachtet werden (Lucchi et al., 2018). Auch für den Nachweis des Erregers der Malaria konnten Hayashida et al. (2017) einen gefriergetrockneten LAMP-Assay entwickeln, der als Probe lediglich einen Tropfen von unkoagulierte Vollblut eines Patienten benötigt.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein direkter Nachweis von Pilzmaterial ohne vorhergehende DNA-Extraktion nicht zufriedenstellend und reproduzierbar erreicht werden. Dazu vorgesehene gespikte Strohproben wurden in Versuchsansätzen mit Hitzedenaturierung (Mikrowellenstrahlung) und mit teilweise mechanischem Aufschluss (Vortexen mit Glasperlen) direkt zum fertigen Mastermix hinzugefügt. In der Literatur wird bei der direkten Testung von Proben ohne vorherige Extraktion, mit Hitzeaufschluss und/oder mechanischem Aufschluss der Probe, eine bis zu zehnfach erhöhte Sensitivität im Vergleich zu unbehandelten Proben beschrieben (Luo et al., 2014; Niessen, 2018). Als Faktor für die korrekt ablaufende LAMP-Reaktion ist ein wichtiger Parameter die Menge an Proben-DNA, die zum Mastermix hinzugefügt wird. Es genügen sehr geringe Mengen an DNA, um ein Amplifikat zu erhalten, doch zu hohe Konzentrationen an DNA hemmen die Reaktion enorm, wie im vorliegenden Versuch aufgezeigt wurde. Beim Aufschluss des Pilzmaterials ohne DNA-Extraktion ist die freigesetzte Menge an DNA unbekannt. Somit ist das Ergebnis schlecht reproduzierbar.

Obwohl die LAMP Methode als robuster als die PCR im Hinblick auf Reaktionsinhibitoren wie Polyphenole, Zuckermoleküle oder andere Probenbestandteile gilt (Niessen, 2018), scheinen Zellwandbestandteile wie Polysachharide oder Melaninpigmente (Ulrich et al., 2016) die LAMP-Reaktion im vorliegenden Artikel zu stark zu beeinträchtigen, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Es wurde aber auch von Bestandteilen von humanem Serum berichtet, die die Reaktion des LAMP-Assays beeinträchtigten (Ihira et al., 2007).

Die in dieser Arbeit entwickelte LAMP Methode kann bereits jetzt für Screening-Zwecke von bereits vorhandenen DNA-Extrakten von *S. chartarum* verwendet werden, um Isolate vom Chemotyp S schnell, kosten- und zeiteffektiv herauszufiltern. Für Anwendungen im Felde ist zum jetzigen Zeitpunkt eine vollständige DNA-Extraktion vonnöten. Bei Überprüfung von kontaminationsverdächtigem Einstreumaterial und Futtermitteln, sowie Bestimmung toxinogener *S. chartarum* Isolate in wasserschädigten Innenräumen ist der Einsatz des LAMP-Assays sinnvoll.

## 5 Zusammenfassung

Der ubiquitär verbreitete Schimmelpilz *S. chartarum* stellt für die Gesundheit von Menschen (Etzel, 2003; Johanning und Yang, 1994) und Tieren (Forgacs et al., 1958) durch sein toxisches Potenzial eine Bedrohung dar. Die besonders zytotoxischen makrozyklischen Trichothecene (Jarvis et al., 1995) können nur vom Chemotyp S dieses Pilzes synthetisiert werden. Die harmloseren Varianten dieser Schimmelpilzart können rein morphologisch (kulturell/mikroskopisch) nicht vom Chemotyp S unterschieden werden.

Determiniert wird dieser toxische Chemotyp durch seine genetische Ausstattung, nämlich der Präsenz des kompletten Satratoxin-Clusters (SC 1-3) (Semeiks et al., 2014; Ulrich et al., 2019). Diese 21 SAT-Gene sind für die Fähigkeit zur Biosynthese von Satratoxinen essentiell und ermöglichen die Unterscheidung zwischen drei Genotypen in *S. chartarum*. Der Genotyp S repräsentiert den Chemotyp S, der in der Lage ist Satratoxine und andere hochtoxische makrozyklische Trichothecene zu produzieren, der Genotyp A und der erst kürzlich beschriebene Genotyp H repräsentieren den Chemotyp A, der Atranone produzieren kann (Ulrich et al., 2019). Die Gene *sat11* bis *sat16* konnten nur in Isolaten von *S. chartarum* gefunden werden, die bei Anzucht makrozyklische Trichothecene produzierten.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine gegenüber der PCR alternative Nukleinsäureamplifikationstechnik verwendet, die loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Bei dieser Methode wird unter Verwendung von vier Oligonucleotid Primern unter isothermalen Bedingungen innerhalb einer Stunde die Ziel-DNA amplifiziert (Notomi et al., 2015; Notomi et al., 2000). Die Ergebnisauswertung erfolgt durch einen Farbumschlag von gelb nach rosa und ist mit bloßem Auge abzulesen, ohne das Mikroreaktionsgefäß öffnen zu müssen. Unter den möglichen Ziel-Genen (*sat11* – *sat16*) für den Nachweis des Chemotyp S in *S. chartarum* per LAMP wurde *sat14* ausgewählt, da es im Vergleich am wenigsten Introns, Basenfehlpaarungen und Einzel-nukleotid-Polymorphismen (SNP) enthält.

In dieser Arbeit wurde die DNA von 227 Schimmelpilzen mit LAMP analysiert, wobei alle 30 Chemotyp S (Genotyp S) Isolate der insgesamt 75 *S. chartarum* Stämme positiv detektiert wurden und keine Kreuzreaktionen mit DNA von anderen Schimmelpilzen auftraten. Diese Ergebnisse lassen den Nachweis von *S. chartarum* Chemotyp S mit der zeit- und kosteneffektiven LAMP Methode zu einem vielversprechenden diagnostischem Werkzeug in der Überwachung der menschlichen und tierischen Gesundheit werden.

## 6 Summary

The ubiquitous mold *S. chartarum* poses a threat to human (Etzel, 2003; Johanning und Yang, 1994) and animal (Forgacs et al., 1958) health due to its toxic potential. Only the chemotype S is able to synthesize the strong cytotoxic macrocyclic trichothecenes (Jarvis et al., 1995). The far more harmless variants of this mold cannot be distinguished from the chemotype S morphologically (by culture/microscopic). This toxic chemotype is determined by its genetic makeup - the presence of the complete satratoxin cluster (SC 1-3) (Semeiks et al., 2014; Ulrich et al., 2019). These 21 SAT genes are essential for the ability to biosynthesize satratoxins and enable the distinction between the three genotypes in *S. chartarum*. Genotype S represents the chemotype S, which is able to produce satratoxins and other highly toxic macrocyclic trichothecenes, the genotype A and the recently described genotype H represent the chemotype A, which produces atranones as mycotoxins (Ulrich et al., 2019). The genes *sat11* to *sat16* are exclusively present in isolates of *S. chartarum* which produced macrocyclic trichothecenes in culture.

Detection methods such as the polymerase chain reaction (PCR) are time-consuming and expensive. In the present work an alternative nucleic acid amplification technique was used, the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) (Notomi et al., 2015; Notomi et al., 2000). In this method, the target DNA is amplified within one hour using four oligonucleotide primers under isothermal conditions. The results are shown by a color change from yellow to pink and can be read with the naked eye without opening the reaction vessel. Among the possible target genes (*sat11* - *sat16*), *sat14* was used for the detection of chemotype S by LAMP, because in comparison it contains the fewest introns, mismatches and single nucleotide polymorphisms (SNP).

In this work, the DNA of 227 molds was analyzed with LAMP. All 30 chemotype (genotype) S among the 75 *S. chartarum* isolates were positively detected and no cross-reactions with DNA from other fungi occurred. These results make the detection of *S. chartarum* chemotype S with the time- and costeffective LAMP method a promising diagnostic tool in the monitoring of human and animal health.

## 7 Literaturverzeichnis

(CDC), C. F. D. C. A. P. (2000) Update: Pulmonary hemorrhage/hemosiderosis among infants--Cleveland, Ohio, 1993-1996. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 49, 180-184

ABBAS, H. K., JOHNSON, B. B., SHIER, W. T., TAK, H., JARVIS, B. B. & BOYETTE, C. D. (2002) Phytotoxicity and mammalian cytotoxicity of macrocyclic trichothecene mycotoxins from *Myrothecium verrucaria*. *Phytochemistry* 59, 309-313

ABDEL-HAFEZ, S. I. I. & EL-SAID, A. H. M. (1997) Effect of garlic, onion and sodium benzoate on the mycoflora of pepper, cinnamon and rosemary in Egypt. *International Biodeterioration & Biodegradation* 39, 67-77

ABDEL-HAFEZ, S. & EL NAGGAR, S. (2006) Morphological, reproductive and mycobiota characters of three wild medicinal plants inhabiting Western Mediterranean coastal land, Egypt. *Feddes Repertorium: Zeitschrift für botanische Taxonomie und Geobotanik* 117, 240-249

ALTMAN, F. P. (1976) Tetrazolium Salts and Formazans. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* 9, III-51

ANDERSEN, B., NIELSEN, K. F. & JARVIS, B. B. (2002) Characterization of *Stachybotrys* from water-damaged buildings based on morphology, growth, and metabolite production. *Mycologia* 94, 392-403

ANDERSEN, B., NIELSEN, K. F., THRANE, U., SZARO, T., TAYLOR, J. W. & JARVIS, B. B. (2003) Molecular and phenotypic descriptions of *Stachybotrys chlorohalonata* sp. nov. and two chemotypes of *Stachybotrys chartarum* found in water-damaged buildings. *Mycologia* 95, 1227-1258

ANDERSEN, B. & NISSEN, A. T. (2000) Evaluation of media for detection of *Stachybotrys* and *Chaetomium* species associated with water-damaged buildings. *International Biodeterioration & Biodegradation* 46, 111-116

ANDERSSON, M. A., NIKULIN, M., KOLJALG, U., ANDERSSON, M. C., RAINEY, F., REIJULA, K., HINTIKKA, E. L. & SALKINOJA-SALONEN, M. (1997) Bacteria, molds, and toxins in water-damaged building materials. *Appl Environ Microbiol* 63, 387-393

APPELT, S., ALY, S. S., TONOOKA, K., GLENN, K., XUE, Z., LEHENBAUER, T. W. & MARCO, M. L. (2019) Development and comparison of loop-mediated isothermal amplification and quantitative polymerase chain reaction assays for the detection of *Mycoplasma bovis* in milk. *Journal of Dairy Science* 102, 1985-1996

BARRON, G. L. & PETERSON, J. L. (1968) The Genera of Hyphomycetes from Soil. *Soil Science* 106, 477

BATA, A., HARRACH, B., UJSZÁSZI, K., KIS-TAMÁS, A. & LÁSZTITY, R. (1985) Macrocyclic Trichothecene toxins produced by *Stachybotrys atra* strains isolated in Middle Europe. *Appl Environ Microbiol* 49, 678-681

- BENNETT, J. W. & BENTLEY, R. (1989) What's in a Name?—Microbial Secondary Metabolism. In *Advances in Applied Microbiology*. Hrsg. NEIDLEMAN, S. L., Academic Press. 1-28
- BIERMAIER, B., GOTTSCHALK, C., SCHWAIGER, K. & GAREIS, M. (2015) Occurrence of *Stachybotrys chartarum* chemotype S in dried culinary herbs. *Mycotoxin Research* 31, 23-32
- BISBY, G. R. (1943) *Stachybotrys*. *Transactions of the British Mycological Society* 26, 133-143
- BORENFREUND, E. & PUERNER, J. A. (1985) Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett* 24, 119-124
- BRASEL, T. L., MARTIN, J. M., CARRIKER, C. G., WILSON, S. C. & STRAUS, D. C. (2005) Detection of airborne *Stachybotrys chartarum* macrocyclic trichothecene mycotoxins in the indoor environment. *Appl Environ Microbiol* 71, 7376-7388
- BUSAM, L. & HABERMEHL, G. G. (1982) Accumulation of mycotoxins by *Baccharis coridifolia*: A reason for livestock poisoning. *Naturwissenschaften* 69, 392-393
- BUSBY, W. & WOGAN, G. (1984) Aflatoxins. In *Chemical Carcinogens*. 2 edn. Hrsg. SEARLE, C. Washington DC, American Chemical Society. 945-1136
- CATANIA, M., HLADKI, A., SCHIAVONE, M. & RAMALLO, J. (1998) Contribución al conocimiento de la micoflora en *Nicotiana tabacum* L. var. Burley. *Lilloa*, 109-113
- CHUNG, Y.-J., JARVIS, B. B., TAK, H. & PESTKA, J. J. (2003) Immunochemical assay for satratoxin G and other macrocyclic trichothecenes associated with indoor air contamination by *Stachybotrys chartarum*. *Toxicol Mech Methods* 13, 247-252
- CHUNYU, W. X., DING, Z. G., LI, M. G., ZHAO, J. Y., GU, S. J., GAO, Y., WANG, F., DING, J. H. & WEN, M. L. (2016) Stachartins A–E, Phenylspirodrimanones from the Tin Mine Tailings-Associated Fungus *Stachybotrys chartarum*. *Helvetica Chimica Acta* 99, 583-587
- COLE, R. J. & COX, R. H. (1981) *Handbook of toxic fungal metabolites*. New York, Academic Press Inc.
- COLE, R. J., JARVIS, B. B. & SCHWEIKERT, M. A. (2003) *Handbook of secondary fungal metabolites*. London, Academic Press
- COOLEY, J. D., WONG, W. C., JUMPER, C. A. & STRAUS, D. C. (1998) Correlation between the prevalence of certain fungi and sick building syndrome. *Occup Environ Med* 55, 579-584
- COPE, R. B. (2018) Chapter 75 - Trichothecenes. In *Veterinary Toxicology (Third Edition)*. Hrsg. GUPTA, R. C., Academic Press. 1043-1053
- CORDA, A. C. J. (1837) *Icones fungorum hucusque cognitorum*. In *Historiae Naturalis Classica (Reprint 1963)*. Hrsg. CRAMER, J., SWANN, H. K. New York, Wheldon & Wesley, LTD and Hafner Publishing Co. Codidote, Herts.
- CROFT, W. A., JARVIS, B. B. & YATAWARA, C. S. (1986) Airborne Outbreak of Trichothecene Toxicosis. *Atmospheric Environment* 20, 549-552

- CRUSE, M., TELERANT, R., GALLAGHER, T., LEE, T. & TAYLOR, J. W. (2002) Cryptic species in *Stachybotrys chartarum*. *Mycologia* 94, 814-822
- DANKÓ, G. (1975) Stachybotryotoxicosis and Immunosuppression. *International Journal of Environmental Studies* 8, 209-211
- DANKÓ, G. & TANYI, J. (1968) Stachybotryotoxicosis in horses. *Magyar Allatorvosok Lapja* 23, 225-229
- DEARBORN, D. G., SMITH, P. G., DAHMS, B. B., ALLAN, T. M., SORENSON, W. G., MONTANA, E. & ETZEL, R. A. (2002) Clinical profile of 30 infants with acute pulmonary hemorrhage in Cleveland. *Pediatrics* 110, 627-637
- DENSCHLAG, C., RIEDER, J., VOGEL, R. F. & NIESSSEN, L. (2014) Real-time loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for group specific detection of important trichothecene producing *Fusarium* species in wheat. *International Journal of Food Microbiology* 177, 117-127
- DENSCHLAG, C., VOGEL, R. F. & NIESSSEN, L. (2012) Hyd5 gene-based detection of the major gushing-inducing *Fusarium* spp. in a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *International Journal of Food Microbiology* 156, 189-196
- DENSCHLAG, C., VOGEL, R. F. & NIESSSEN, L. (2013) Hyd5 gene based analysis of cereals and malt for gushing-inducing *Fusarium* spp. by real-time LAMP using fluorescence and turbidity measurements. *International Journal of Food Microbiology* 162, 245-251
- DOŠEN, I., ANDERSEN, B., PHIPPEN, C. B., CLAUSEN, G. & NIELSEN, K. F. (2016) *Stachybotrys* mycotoxins: from culture extracts to dust samples. *Analytical and bioanalytical chemistry* 408, 5513-5526
- DROBOTKO, V. G. (1945) Stachybotryotoxicosis. A new disease of horses and humans. *Am. Rev. Soviet Med.* 2, 238-242
- EKRUTH, J. C. (2021) Untersuchungen zur Differenzierung von *Stachybotrys chartarum*-Chemotypen mittels Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie. In Tierärztliche Fakultät, Veterinärwissenschaftliches Department. München, LMU München
- EL-BANNA, A. A., PITT, J. I. & LEISTNER, L. (1987) Production of Mycotoxins by *Penicillium* Species. *Systematic and Applied Microbiology* 10, 42-46
- EL-KADY, I. A., EL-MARAGHY, S. S. M. & EMAN MOSTAFA, M. (1992) Contribution of the mesophilic fungi of different spices in Egypt. *Mycopathologia* 120, 93-101
- EL-KADY, I. A. & MOUBASHER, M. H. (1982) Toxigenicity and toxins of *Stachybotrys* isolates from wheat straw samples in Egypt. *Experimental Mycology* 6, 25-30
- ELLIS, M. B. (1971) Dematiaceous hyphomycetes. The Commonwealth Mycological Institute, England
- ENCYCLOPEDIA OF LIFE (2021) *Stachybotrys chartarum* (Ehrenb.) S. Hughes 1958. <https://eol.org/pages/997582/names>. Letzter Zugriff 21.01.2021

- ENDO, S., KOMORI, T., RICCI, G., SANO, A., YOKOYAMA, K., OHORI, A., KAMEI, K., FRANCO, M., MIYAJI, M. & NISHIMURA, K. (2004) Detection of *gp43* of *Paracoccidioides brasiliensis* by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *FEMS Microbiol Lett* 234, 93-97
- ETZEL, R., MONTANA, E., SORENSON, W. G., KULLMAN, G., MILLER, J. D., JARVIS, B. & DEARBORN, D. G. (1996) Pulmonary hemosiderosis associated with exposure to *Stachybotrys atra*: T 78. *Epidemiology* 7, S38
- ETZEL, R. A. (2003) *Stachybotrys*. *Current Opinion in Pediatrics* 15, 103-106
- ETZEL, R. A., MONTANA, E., SORENSON, W. G., KULLMAN, G. J., ALLAN, T. M. & DEARBORN, D. G. (1998) Acute pulmonary hemorrhage in infants associated with exposure to *Stachybotrys atra* and other fungi. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 152, 757-762
- FAKRUDDIN, M. (2011) Loop mediated isothermal amplification (LAMP)—an alternative to polymerase chain reaction (PCR). *Bangladesh Res. Publ. J* 5
- FALLAHI, S., MAZAR, Z. A., GHASEMIAN, M. & HAGHIGHI, A. (2015) Challenging loop—mediated isothermal amplification (LAMP) technique for molecular detection of *Toxoplasma gondii*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 8, 366-372
- FEINBERG, B., MCLAUGHLIN, C. S. & BEASLEY, V. (1989) Biochemical mechanism of action of trichothecene mycotoxins. CRC Press, Boca Raton, Florida, 27-35
- FENN, J., MANN, M., MENG, C., WONG, S. & WHITEHOUSE, C. (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246, 64-71
- FISCHER, G. & DOTT, W. (2003) Relevance of airborne fungi and their secondary metabolites for environmental, occupational and indoor hygiene. *Archives of Microbiology* 179, 75-82
- FORGACS, J. (1972) *Stachybotryotoxicosis*. In *Fungal Toxins*. Hrsg. KADIS, A., L., A. J., CIEGLER. New York, United States of America, Academic Press. 95 - 128
- FORGACS, J., CARLL, W. T., HERRING, A. S. & HINSHAW, W. R. (1958) Toxicity of *Stachybotrys atra* for animals. *Trans N Y Acad Sci* 20, 787-808
- FRAZER, S., MAGAN, N. & ALDRED, D. (2011) The influence of water activity and temperature on germination, growth and sporulation of *Stachybotrys chartarum* strains. *Mycopathologia* 172, 17-23
- FRISCH, L. M., MANN, M. A., MAREK, D. N. & NIESSEN, L. (2021) Development and optimization of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the species-specific detection of *Penicillium expansum*. *Food Microbiology* 95, 103681
- FRISCH, L. M. & NIESSEN, L. (2019) Development and optimization of a group-specific loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of patulin-producing *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology* 298, 20-30
- FROMME, H., GAREIS, M., VÖLKE, W. & GOTTSCHALK, C. (2016) Overall internal exposure to mycotoxins and their occurrence in occupational and residential settings – An overview. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 219, 143-165



- GAREIS, M. (1994) Cytotoxicity testing of samples originating from problem buildings. In *Fungi and Bacteria in Indoor Air Environments*. Hrsg. JOHANNING, E., YANG, C. S. Saratoga Springs, New York, Eastern New York Occupational Health Program. 139-144
- GAREIS, M. (2006) Diagnostischer Zellkulturtest (MTT-Test) für den Nachweis von zytotoxischen Kontaminanten und Rückständen. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 1, 354-363
- GAREIS, M. & GÖBEL, E. (1998) Aufnahme und Verbreitung von Ochratoxin A durch Milben (*Tyrophagus casei*). In *Proceedings 20. Mykotoxin-Workshop*. Hrsg. WOLFF J., BETSCHE T. Detmold, Deutschland. 29-31
- GAREIS, M. & GOTTSCHALK, C. (2014) *Stachybotrys* spp. and the guttation phenomenon. *Mycotoxin Research* 30, 151-159
- GAREIS, M., HERBST, E. & GOTTSCHALK, C. (2011) Toxic droplets produced by *Stachybotrys chartarum*. In *International Scientific Conference on Bioaerosols, Fungi, Bacteria, Mycotoxins in Indoor and Outdoor Environments and Human Health*. Saratoga Springs, New York
- GENEVIEVE S. BONDY, J. J. P. (2000) Immunomodulation by fungal toxins. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 3, 109-143
- GHERBAWY, Y. A., SHEBANY, Y. M. & EL-DAWY, E. G. A. E. M. (2021) Detection of *Stachybotrys chartarum* isolates from faba beans dust during threshing. *Archives of Microbiology* 203, 5591-5598
- GHERGARIU, S., BABA, A., DANIELESCU, N., ROTARU, O., GIURGIU, G. & SPINU, O. (1990) An outbreak of stachybotryotoxicosis in calves. *Zootehnie și Medicină Veterinară* 40, 32-37
- GOTTSCHALK, C., BAUER, J. & MEYER, K. (2006) Determination of macrocyclic trichothecenes in mouldy indoor materials by LC-MS/MS. *Mycotoxin Res* 22, 189-192
- GOTTSCHALK, C., BAUER, J. & MEYER, K. (2008) Detection of satratoxin g and h in indoor air from a water-damaged building. *Mycopathologia* 166, 103-107
- GRÄFE, U. (1993) Ciba Foundation Symposium 171, Secondary Metabolites: Their Function and Evolution. *Journal of Basic Microbiology* 33, 310-310
- GRAVESEN, S., NIELSEN, P. A., IVERSEN, R. & NIELSEN, K. F. (1999) Microfungal contamination of damp buildings--examples of risk constructions and risk materials. *Environ Health Perspect* 107, 505-508
- GREBE, S. K. & SINGH, R. J. (2011) LC-MS/MS in the clinical laboratory - where to from here? *The Clinical biochemist. Reviews* 32, 5-31
- GUTLEB, A. C., MORRISON, E. & MURK, A. J. (2002) Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by *Fusarium* strains: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 11, 309-320
- HANELT, M., GAREIS, M. & KOLLARCZIK, B. (1994) Cytotoxicity of mycotoxins evaluated by the MTT-cell culture assay. *Mycopathologia* 128, 167-174

- HARRACH, B., BATA, A., BAJMOCY, E. & BENKO, M. (1983a) Isolation of satratoxins from the bedding straw of a sheep flock with fatal stachybotryotoxicosis. *Appl Environ Microbiol* 45, 1419-1422
- HARRACH, B., BATA, A., SANDOR, G. & VANYI, A. (1987) Isolation of macrocyclic and non-macrocyclic trichothecenes (*stachybotrys* and *fusarium* toxins) from the Environment of 200 III Sport Horses. *Mycotoxin Res* 3, 65-68
- HARRACH, M., BATA, A., VEZER, F. & BURUCS, B. (1983b) Isolation of verrucarins J, Satratoxin G and H from *Stachybotrys-atra* infected bedding straw of sports horses with mass disease. *Acta Microbiol Hung* 31, 304
- HÄRRI, E., LOEFFLER, W., SIGG, H. P., STÄHELIN, H., TAMM, C. S. C. & WIESINGER, D. (1962) Über die Verrucarine und Roridine, eine Gruppe von cytostatisch hochwirksamen Antibiotica aus *Myrothecium*-Arten. *Helvetica Chimica Acta* 45, 839-853
- HASLAM, E. (1986) Secondary metabolism – fact and fiction. *Natural Product Reports* 3, 217-249
- HAUGLAND, R. A. & HECKMAN, J. L. (1998) Identification of putative sequence specific PCR primers for detection of the toxigenic fungal species *Stachybotrys chartarum*. *Mol Cell Probes* 12, 387-396
- HAUGLAND, R. A., VESPER, S. J. & HARMON, S. M. (2001) Phylogenetic relationships of *Memnoniella* and *Stachybotrys* species and evaluation of morphological features for *Memnoniella* species identification. *Mycologia* 93, 54-65
- HAYASHIDA, K., KAJINO, K., HACHAAMBWA, L., NAMANGALA, B. & SUGIMOTO, C. (2015) Direct blood dry LAMP: A rapid, stable, and easy diagnostic tool for Human African Trypanosomiasis. *PLoS neglected tropical diseases* 9, e0003578
- HAYASHIDA, K., KAJINO, K., SIMUKOKO, H., SIMUUNZA, M., NDEBE, J., CHOTA, A., NAMANGALA, B. & SUGIMOTO, C. (2017) Direct detection of *falciparum* and non-*falciparum* malaria DNA from a drop of blood with high sensitivity by the dried-LAMP system. *Parasites & Vectors* 10, 26
- HIBBETT, D. S. & TAYLOR, J. W. (2013) Fungal systematics: is a new age of enlightenment at hand? *Nature Reviews Microbiology* 11, 129-133
- HINKLEY, S. F., JIANG, J., MAZZOLA, E. P. & JARVIS, B. B. (1999) Atranones: Novel diterpenoids from the toxigenic mold *Stachybotrys atra*. *Tetrahedron Letters* 40, 2725-2728
- HINKLEY, S. F., MAZZOLA, E. P., FETTINGER, J. C., LAM, Y. F. & JARVIS, B. B. (2000) Atranones A-G, from the toxigenic mold *Stachybotrys chartarum*. *Phytochemistry* 55, 663-673
- HINKLEY, S. F., MOORE, J. A., SQUILLARI, J., TAK, H., OLESZEWSKI, R., MAZZOLA, E. P. & JARVIS, B. B. (2003) New atranones from the fungus *Stachybotrys chartarum*. *Magnetic Resonance in Chemistry* 41, 337-343

- HINTIKKA, E.-L. (1977) The genus *Stachybotrys*. In *Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicosis. An Encyclopedia Handbook*. Hrsg. WYLLIE, T. D., MOREHOUSE, L. G. New York, Basel, Marcel Dekker Inc. 91-98
- HINTIKKA, E.-L. (1978) Human stachybotryotoxicosis. In *Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicosis*. Hrsg. WYLLIE, T. D., MOREHOUSE, L. G. New York, Marcel Dekker Inc. 87-89
- HODGSON, M., LEVIN, H. & WOLKOFF, P. (1994) Volatile organic compounds and indoor air. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 94, 296-303
- HODGSON, M. J., MOREY, P., LEUNG, W.-Y., MORROW, L., MILLER, D., JARVIS, B. B., ROBBINS, H., HALSEY, J. F. & STOREY, E. (1998) Building-associated pulmonary disease from exposure to *Stachybotrys chartarum* and *Aspergillus versicolor*. *Journal of Occupational and Environmental Medicine* 40, 241-249
- HUNTER, C. A., GRANT, C., FLANNIGAN, B. & BRAVERY, A. F. (1988) Mold in buildings - the air spora of domestic dwellings. *International Biodeterioration* 24, 81-101
- IBRAGIMOVA, S., PRUNTOVA, O., DANILCHENKO, S. & YEROFEEVA, Y. S. (2021) Determination of fungal genera composition and total toxicity of feed produced in the Republic of Crimea. *Veterinary Science Today*, 290-297
- IHIRA, M., AKIMOTO, S., MIYAKE, F., FUJITA, A., SUGATA, K., SUGA, S., OHASHI, M., NISHIMURA, N., OZAKI, T., ASANO, Y. & YOSHIKAWA, T. (2007) Direct detection of human herpesvirus 6 DNA in serum by the loop-mediated isothermal amplification method. *Journal of Clinical Virology* 39, 22-26
- IVANICS, E., GLAVITS, R., VANYI, A., ETTER, L. & SZABO, E. (1990) Field case of stachybotryotoxicosis in poultry. *Magyar Allatorvosok Lapja* 45, 205-209
- JABAR, F., ABDALZAHRAA, A. & HOSSAIN, A. O. (2020) Histological changes for *Stachybotrys chartarum* fungus in the lungs and nose for infant white mice. *Indian Journal of Public Health Research & Development* 11, 2194-2199
- JAGELS, A., LINDEMANN, V., ULRICH, S., GOTTSCHALK, C., CRAMER, B., HÜBNER, F., GAREIS, M. & HUMPF, H.-U. (2019) Exploring secondary metabolite profiles of *Stachybotrys* spp. by LC-MS/MS. *Toxins* 11, 133
- JAGELS, A., STEPHAN, F., ERNST, S., LINDEMANN, V., CRAMER, B., HÜBNER, F. & HUMPF, H.-U. (2020) Artificial vs natural *Stachybotrys* infestation—Comparison of mycotoxin production on various building materials. *Indoor Air* 30, 1268-1282
- JARMAI, K. (1929) Viskosusseptikaemien bei älteren Fohlen und erwachsenen Pferden. *Dt. Tierärztl. Wschr.* 33, 517-519
- JARVIS, B. B. (2003) *Stachybotrys chartarum*: a fungus for our time. *Phytochemistry* 64, 53-60
- JARVIS, B. B., ÇÖMEZOĞLU, S. N., AMMON, H. L., BREEDLOVE, C. K., MILLER, R. W., WOODE, M. K., STREELMAN, D. R., SNEDEN, A. T., DAILEY, R. G., KUPCHAN, S. M. & BRYAN, R. (1987) New macrocyclic trichothecenes from *Baccharis megapotamica*. *J Nat Prod* 50, 815-828

- JARVIS, B. B., EPPLEY, R. M. & MAZZOLA, E. P. (1983) Chemistry of trichothecenes - Chemistry and bioproduction of macrocyclic trichothecenes. In *Trichothecenes - Chemical, Biological and Toxicological Aspects*. Hrsg. UENO, Y. Amsterdam, Elsevier Science Publishers B.V. 20-38
- JARVIS, B. B., MIDIWO, J. O., BEAN, G. A., ABOUL-NASR, M. B. & BARROS, C. S. (1988) The mystery of trichothecene antibiotics in *Baccharis* species. *J Nat Prod* 51, 736-744
- JARVIS, B. B., MIDIWO, J. O., TUTHILL, D. & BEAN, G. A. (1981) Interaction between the antibiotic trichothecenes and the higher plant *Baccharis megapotamica*. *Science* 214, 460-462
- JARVIS, B. B. & MILLER, J. D. (2005) Mycotoxins as harmful indoor air contaminants. *Appl Microbiol Biotechnol* 66, 367-372
- JARVIS, B. B., SALEMME, J. & MORAIS, A. (1995) *Stachybotrys* toxins. 1. *Nat Toxins* 3, 10-16
- JARVIS, B. B., SORENSON, W. G., HINTIKKA, E. L., NIKULIN, M., ZHOU, Y., JIANG, J., WANG, S., HINKLEY, S., ETZEL, R. A. & DEARBORN, D. (1998) Study of toxin production by isolates of *Stachybotrys chartarum* and *Memnoniella echinata* isolated during a study of pulmonary hemosiderosis in infants. *Appl Environ Microbiol* 64, 3620-3625
- JARVIS, B. B., ZHOU, Y., JIANG, J., WANG, S., SORENSON, W. G., HINTIKKA, E. L., NIKULIN, M., PARIKKA, P., ETZEL, R. A. & DEARBORN, D. G. (1996) Toxicogenic molds in water-damaged buildings: dechlorogriseofulvins from *Memnoniella echinata*. *J Nat Prod* 59, 553-554
- JOHANNING, E. (1994) Health problems related to fungal exposure - the example of toxigenic *Stachybotrys chartarum*. In *Fungi and Bacteria in Indoor Air Environments*. Hrsg. JOHANNING, E., YANG, C. S. Saratoga Springs, New York. 169-182
- JOHANNING, E., BIAGINI, R., HULL, D., MOREY, P., JARVIS, B. & LANDSBERGIS, P. (1996) Health and immunology study following exposure to toxigenic fungi (*Stachybotrys chartarum*) in a water-damaged office environment. *Int. Arch Occup Environ Health* 68, 207-218
- JOHANNING, E., GAREIS, M., YANG, C. S., HINTIKKA, E. L., NIKULIN, M., JARVIS, B. B. & DIETRICH, R. (1998) Toxicity screening of materials from buildings with fungal indoor air quality problems (*Stachybotrys chartarum*). *Mycotoxin Res* 14, 60-73
- JOHANNING, E., LANDSBERGIS, P., GAREIS, M., YANG, C. S. & OLMSTED, E. (1999) Clinical experience and results of a Sentinel Health Investigation related to indoor fungal exposure. *Environ Health Perspect* 107 Suppl 3, 489-494
- JOHANNING, E. & YANG, C. (1994) Health problems related to fungal exposure—the example of toxigenic *Stachybotrys chartarum*. Eastern New York Occupational Health Program—CHP, 169-182
- JOLLÈS, P. & MUZZARELLI, R. A. A. (1999) *Chitin and Chitinases*. Basel, Schweiz, Birkhäuser Verlag
- KANETO, R., DOBASHI, K., KOJIMA, I., SAKAI, K., SHIBAMOTO, N., YOSHIOKA, T., NISHIDA, H., OKAMOTO, R., AKAGAWA, H. & MIZUNO, S. (1994) Mer-NF5003B, E and F, novel sesquiterpenoids as avian myeloblastosis virus protease inhibitors produced by *Stachybotrys* sp. *J Antibiot* 47, 727-730

- KIM, J. W., KO, S.-K., KIM, H.-M., KIM, G.-H., SON, S., KIM, G. S., HWANG, G. J., JEON, E. S., SHIN, K.-S. & RYOO, I.-J. (2016) Stachybotrysin, an osteoclast differentiation inhibitor from the marine-derived fungus *Stachybotrys* sp. KCB13F013. *J Nat Prod* 79, 2703-2708
- KORNEEV, N. (1948) Mycotoxicosis in laboratory animals. *Veterinariia* 25, 36
- KORPINEN, E.-L. (1973) Studies on *stachybotrys alternans* I. isolation of toxicogenic strains from finnish grains and feeds. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology and Immunology* 81B, 191-197
- KOSSWIG, C. (1961) Über sogenannte homologe Gene. *Zool. Anz.* 166, 333-356
- KUHN, R. C., TRIMBLE, M. W., HOFER, V., LEE, M. & NASSOF, R. S. (2005) Prevalence and airborne spore levels of *Stachybotrys* spp. in 200 houses with water incursions in Houston, Texas. *Can J Microbiol* 51, 25-28
- KUSHIRO, M. (2008) Effects of milling and cooking processes on the deoxynivalenol content in wheat. *Int J Mol Sci* 9, 2127-2145
- LE BARS, J., GERARD, J. & MICHEL, C. (1977) Demonstration of stachybotryotoxicosis in France: a case of acute intoxication in deer. In *Ann Nutr Aliment.* 509
- LE BARS, J. & LE BARS, P. (1985) Etude du nuage de spores de *Stachybotrys atra* contaminant des pailles: risques d'inhalation. *Bulletin de la Société Française de Mycologie Médicale* 14, 321-324
- LEE, J.-S., YONG, S.-J., LIM, H.-Y. & YOON, B.-S. (2015) A simple and sensitive gene-based diagnosis of *Aspergillus flavus* by loop-mediated isothermal amplification in honeybee. *Journal of Apiculture* 30, 53-59
- LEMONS, A. R., CROSTON, T. L., GOLDSMITH, W. T., BARNES, M. A., JADERSON, M. A., PARK, J.-H., MCKINNEY, W., BEEZHOLD, D. H. & GREEN, B. J. (2019) Cultivation and aerosolization of *Stachybotrys chartarum* for modeling pulmonary inhalation exposure. *Inhal Toxicol* 31, 446-456
- LEVIN, H. (1995) Physical factors in the indoor environment. *Occupational medicine (Philadelphia, Pa.)* 10, 59-94
- LEWIŃSKA, A. M., PEUHKURI, R. H., RODE, C., ANDERSEN, B. & HOOF, J. B. (2016) Rapid detection and identification of *Stachybotrys* and *Chaetomium* species using tissue PCR analysis. *Journal of Microbiological Methods* 130, 115-122
- LI, S. & HARTMAN, G. L. (2000) First report of *Stachybotrys chartarum* causing soybean root rot. *Plant Disease* 84, 100-100
- LI, S., HARTMAN, G. L., JARVIS, B. B. & TAK, H. (2002) A *Stachybotrys chartarum* isolate from soybean. *Mycopathologia* 154, 41-49
- LI, Y.-F., ZHANG, P.-P., YAN, S.-J., XU, J.-Y., NIAZ, S.-I., CHAND, R., EDDIE MA, C. H., LIN, Y.-C., LI, J. & LIU, L. (2017) Atranes with enhancement neurite outgrowth capacities from the crinoid-derived fungus *stachybotrys chartarum* 952. *Tetrahedron* 73, 7260-7266

- LIU, H.-X., LIU, W.-Z., CHEN, Y.-C., SUN, Z.-H., TAN, Y.-Z., LI, H.-H. & ZHANG, W.-M. (2016) Cytotoxic trichothecene macrolides from the endophyte fungus *Myrothecium roridum*. *Journal of Asian Natural Products Research* 18, 684-689
- LIU, J., JIA, X., ZHAO, J., FENG, J., CHEN, M., CHEN, R., XIE, K., CHEN, D., LI, Y., ZHANG, D., PENG, Y., SI, S. & DAI, J. (2020) Bistachybotrynsins L–V, bioactive phenylspirodrimane dimers from the fungus *Stachybotrys chartarum*. *Organic Chemistry Frontiers* 7, 531-542
- LOMBARD, L., HOUBRAKEN, J., DECOCK, C., SAMSON, R. A., MEIJER, M., RÉBLOVÁ, M., GROENEWALD, J. Z. & CROUS, P. W. (2016) Generic hyper-diversity in *Stachybotriaceae*. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 36, 156-246
- LOUKACI, A., KAYSER, O., BINDSEIL, K. U., SIEMS, K., FREVERT, J. & ABREU, P. M. (2000) New Trichothecenes Isolated from *Holarrhena floribunda*. *J Nat Prod* 63, 52-56
- LUCCHI, N. W., NDIAYE, D., BRITTON, S. & UDHAYAKUMAR, V. (2018) Expanding the malaria molecular diagnostic options: opportunities and challenges for loop-mediated isothermal amplification tests for malaria control and elimination. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 18, 195-203
- LUO, J., TANIWAKI, M. H., IAMANAKA, B. T., VOGEL, R. F. & NIESSEN, L. (2014) Application of loop-mediated isothermal amplification assays for direct identification of pure cultures of *Aspergillus flavus*, *A. nomius*, and *A. caelatus* and for their rapid detection in shelled Brazil nuts. *International Journal of Food Microbiology* 172, 5-12
- MAGAN, N. & OLSEN, M. (2004) *Mycotoxins in food: detection and control*, Woodhead Publishing
- MAHMOUDI, M. & GERSHWIN, M. E. (2000) Sick Building Syndrome. III. *Stachybotrys chartarum*. *Journal of Asthma* 37, 191-198
- MARASAS, W. F. O., NELSON, P. E. & TOUSSOUN, T. (1984) *Toxigenic Fusarium species: Identity and mycotoxicology*, Pennsylvania State University
- MÄRTLBAUER, E., GAREIS, M. & TERPLAN, G. (1988) Enzyme immunoassay for the macrocyclic trichothecene roridin A: Production, properties, and use of rabbit antibodies. *Appl Environ Microbiol* 54, 225-230
- MAYER, S., CURTUI, V., USLEBER, E. & GAREIS, M. (2007) Airborne mycotoxins in dust from grain elevators. *Mycotoxin Research* 23, 94-100
- MCCORMICK, S. P., STANLEY, A. M., STOVER, N. A. & ALEXANDER, N. J. (2011) Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins. *Toxins* 3, 802-814
- MIDDLEBROOK, J. L. & LEATHERMAN, D. L. (1989) Specific association of T-2 toxin with mammalian cells. *Biochemical Pharmacology* 38, 3093-3102
- MILLER, J. D., RAND, T. G. & JARVIS, B. B. (2003) *Stachybotrys chartarum*: cause of human disease or media darling? *Medical Mycology* 41, 271-291

- MORALES, H., SANCHIS, V., COROMINES, J., RAMOS, A. J. & MARÍN, S. (2008) Inoculum size and intraspecific interactions affects *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation in apples. *Food Microbiology* 25, 378-385
- MOSMANN, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63
- MUSSALO-RAUHAMAA, H., NIKULIN, M., KOUKILA-KÄHKÖLÄ, P., HINTIKKA, E.-L., MALMBERG, M. & HAAHTELA, T. (2010) Health Effects of Residents Exposed to *Stachybotrys* in Water-damaged Houses in Finland. *Indoor and Built Environment* 19, 476-485
- NAGAMINE, K., HASE, T. & NOTOMI, T. (2002) Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes* 16, 223-229
- NEJAT-SALARI, A. & ERSHAD, D. (1994) An investigation on mycoflora of barley seeds in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 30, 23-28
- NIELSEN, K. F. (2003) Mycotoxin production by indoor molds. *Fungal Genet Biol* 39, 103-117
- NIELSEN, K. F., HOLM, G., UTTRUP, L. P. & NIELSEN, P. A. (2004) Mould growth on building materials under low water activities. Influence of humidity and temperature on fungal growth and secondary metabolism. *International Biodeterioration & Biodegradation* 54, 325-336
- NIELSEN, K. F., THRANE, U., LARSEN, T. O., NIELSEN, P. A. & GRAVESEN, S. (1998) Production of mycotoxins on artificially inoculated building materials. *International Biodeterioration & Biodegradation* 42, 9-16
- NIESSEN, L. (2007) PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology* 119, 38-46
- NIESSEN, L. (2015) Current state and future perspectives of loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based diagnosis of filamentous fungi and yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* 99, 553-574
- NIESSEN, L. (2018) The application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for the rapid diagnosis of food-borne mycotoxigenic fungi. *Current Opinion in Food Science* 23, 11-22
- NIESSEN, L., BECHTNER, J., FODIL, S., TANIWAKI, M. H. & VOGEL, R. F. (2018) LAMP-based group specific detection of aflatoxin producers within *Aspergillus* section *Flavi* in food raw materials, spices, and dried fruit using neutral red for visible-light signal detection. *International Journal of Food Microbiology* 266, 241-250
- NIESSEN, L., GRÄFENHAN, T. & VOGEL, R. F. (2012) ATP citrate lyase 1 (*acl1*) gene-based loop-mediated amplification assay for the detection of the *Fusarium tricinctum* species complex in pure cultures and in cereal samples. *International Journal of Food Microbiology* 158, 171-185
- NIESSEN, L. & VOGEL, R. F. (2010) Detection of *Fusarium graminearum* DNA using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *International Journal of Food Microbiology* 140, 183-191

- NIKULIN, M., PASANEN, A.-L., BERG, S. & HINTIKKA, E.-L. (1994) *Stachybotrys atra* growth and toxin production in some building materials and fodder under different relative humidities. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 3421- 3424
- NOTOMI, T., MORI, Y., TOMITA, N. & KANDA, H. (2015) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *Journal of Microbiology* 53, 1-5
- NOTOMI, T., OKAYAMA, H., MASUBUCHI, H., YONEKAWA, T., WATANABE, K., AMINO, N. & HASE, T. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 28, e63-e63
- OU, S.-C., GIAMBRONE, J. J. & MACKLIN, K. S. (2012) Comparison of a TaqMan real-time polymerase chain reaction assay with a loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Gallid herpesvirus 1*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 24, 138-141
- OZEGOVIĆ, L., PAVLOVIĆ, R. & MILOSEV, B. (1971) Toxic dermatitis, conjunctivitis, rhinitis, pharyngitis and laryngitis in fattening cattle and farm workers caused by moulds from contaminated straw (stachybotryotoxicosis?). *Veterinaria, Sarajevo* 20, 263-267
- PALYUSIK, M. (1970) Experimental stachybotryotoxicosis of young chicks. *Sabouraudia* 8, 4-8
- PESTKA, J. J. (1988) Enhanced surveillance of foodborne mycotoxins by immunochemical assay. *Journal of Association of Official Analytical Chemists* 71, 1075-1081
- PESTKA, J. J. (2008) Mechanisms of deoxynivalenol-induced gene expression and apoptosis. *Food Additives & Contaminants: Part A* 25, 1128-1140
- PESTKA, J. J., YIKE, I., DEARBORN, D. G., WARD, M. D. & HARKEMA, J. R. (2008) *Stachybotrys chartarum*, trichothecene mycotoxins, and damp building-related illness: new insights into a public health enigma. *Toxicol Sci* 104, 4-26
- PINRUAN, U., MCKENZIE, E. H., JONES, E. G. & HYDE, K. D. (2004) Two new species of *Stachybotrys*, and a key to the genus. *Fungal Diversity*
- PRECHA, N., KLIENGCHUAY, W., WOO, C., YAMAMOTO, N. & TANTRAKARNAPA, K. (2020) Fungal assemblages on indoor surfaces with visible mold growth in homes after the 2016 flood disaster in Thailand. *Applied Sciences* 10, 5322
- QIN, Y.-D., FANG, F.-M., ZHOU, J.-J., WANG, R.-B., XU, S.-X., LI, L.-H. & ZHANG, H.-L. (2020) Atranes from *Stachybotrys chartarum* and their antitumor activities in MG-63 human osteosarcoma cells. *Fitoterapia* 146, 104727
- RAND, T. G., FLEMMING, J., DAVID MILLER, J. & WOMILOJU, T. O. (2006) Comparison of inflammatory responses in mouse lungs exposed to atranes A and C from *Stachybotrys chartarum*. *J Toxicol Environ Health A* 69, 1239-1251
- REDLICH, C. A., SPARER, J. & CULLEN, M. R. (1997) Sick-building syndrome. *The Lancet* 349, 1013-1016



- REPONEN, T., HYVARINEN, A., RUUSKANEN, J., RAUNEMAA, T. & NEVALAINEN, A. (1994) Comparison of concentrations and size distributions of fungal spores in buildings with and without mold problems. *Journal of Aerosol Science* 25, 1595-1603
- ROGGO, B. E., PETERSEN, F., SILLS, M., ROESEL, J. L., MOERKER, T. & PETER, H. H. (1996) Novel spirodihydrobenzofuranlactams as antagonists of endothelin and as inhibitors of HIV-1 protease produced by *Stachybotrys* sp. *J Antibiot* 49, 13-19
- SAMSON, R. & FRISVAD, J. (2004) *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes mycotoxins and other extrolites. *Studies in Mycology* 49, 1-251
- SAMSON, R. A., HOUBRAKEN, J., THRANE, U., FRISVAD, J. C. & ANDERSEN, B. (2019) Food and Indoor Fungi, Westerdijk Fungal Biodiversity Institute
- SANTOS, L., MARÍN SILLUÉ, S., SANCHÍS ALMENAR, V. & RAMOS GIRONA, A. J. (2013) Mycotoxin in medicinal/aromatic herbs—a review. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales Aromáticas* 12, 119-142
- SARKISOV, A. J. V. (1947) A toxicologic disease in horses. *Veterinariia* 24, 25
- SARLIN, T., NAKARI-SETÄLÄ, T., LINDER, M., PENTTILÄ, M. & HAIKARA, A. (2005) Fungal hydrophobins as predictors of the gushing activity of malt. *Journal of the Institute of Brewing* 111, 105-111
- SCHNEIDER, D., MARASAS, W., DALE KUYS, J. C., KRIEK, N. & VAN SCHALKWYK, G. (1979) A field outbreak of suspected stachybotryotoxicosis in sheep. *J S Afr Vet Assoc* 50, 73-81
- SCHUMAIER, G., DEVOLT, H. M., LAFFER, N. C. & CREEK, R. D. (1963) Stachybotryotoxicosis of Chicks. *Poultry Science* 42, 70-74
- SEIFERT, K. A., MORGAN-JONES, G., GAMS, W. & KENDRICK, B. (2011) The Genera of Hyphomycetes., Amsterdam, Netherlands, Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)
- SEMEIKS, J., BOREK, D., OTWINOWSKI, Z. & GRISHIN, N. V. (2014) Comparative genome sequencing reveals chemotype-specific gene clusters in the toxigenic black mold *Stachybotrys*. *BMC Genomics* 15, 590
- SEMIS, M., DADWAL, S. S., TEGTMEIER, B. R., WILCZYNSKI, S. P., ITO, J. I. & KALKUM, M. (2020) First Case of Invasive *Stachybotrys* Sinusitis. *Clinical Infectious Diseases* 72, 1386-1391
- SHANK, R. A., FOROUD, N. A., HAZENDONK, P., EUDES, F. & BLACKWELL, B. A. (2011) Current and Future Experimental Strategies for Structural Analysis of Trichothecene Mycotoxins—A Prospectus. *Toxins* 3, 1518-1553
- SKROBOT, F. T., AGLAN, H. A., KITCHENS, S., LUDWICK, A., AMBURGEY, T., BORAZJANI, H. & DIEHL, S. V. (2014) Fungal populations in air and materials in a flood simulation study. *Wood and Fiber Science* 46, 465-479
- SKROBOT III, F., DIEHL, S. V. & BORAZJANI, H. (2017) Mycotoxin production by *Stachybotrys chartarum* on water-damaged building materials. *BioResources* 12, 6490-6503

- STOB, M., BALDWIN, R., TUIITE, J., ANDREWS, F. & GILLETTE, K. (1962) Isolation of an anabolic, uterotrophic compound from corn infected with *Gibberella zeae*. *Nature* 196, 1318-1318
- STRAUS, D. C. (2009) Molds, mycotoxins, and sick building syndrome. *Toxicology and Industrial Health* 25, 617-635
- SUREKHA, M., SAINI, K., REDDY, V. K., REDDY, A. R. & REDDY, S. (2011) Fungal succession in stored rice (*Oryza sativa* Linn.) fodder and mycotoxin production. *African Journal of Biotechnology* 10, 550-555
- SZABÓ, L., RATZ, F., ÁLDÁSY, P., SZABÖ, P. & GAÁL, L. (1970) Skin lesions and rhinitis in pigs attributable to stachybotryotoxicosis. I. Clinical picture and aetiology. *Magyar Allatorvosok Lapja* 25, 21-26
- SZATHMARY, C. I. (1983) Trichothecene toxicoses and natural occurrence in Hungary. In *Trichothecenes: developments in food science*. Hrsg. UENO, Y. Amsterdam, Elsevier. 229-250
- SZEMEREDI, G. (2005) Domestic occurrence of stachybotryotoxicosis in dogs. Case report. *Magyar Allatorvosok Lapja* 127, 727-732
- TEEUW, K. B., VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M. J. E. & VERHOEF, J. (1994) Airborne gram-negative bacteria and endotoxin in Sick Building Syndrome: A study in dutch governmental office buildings. *Archives of Internal Medicine* 154, 2339-2345
- TERR, A. I. (2009) Sick Building Syndrome: is mould the cause? *Medical Mycology* 47, 217-222
- TOMA, F. M. & ABDULLA, N. F. (2013) Isolation and identification of fungi from spices and medicinal plants. *Research Journal of Environmental and Earth Sciences* 5, 131-138
- UENO, Y. (1977) Mode of action of trichothecenes. *Ann Nutr Aliment* 31, 885-900
- UENO, Y. (1983) *Trichothecenes - Chemical, biological and toxicological aspects*. Amsterdam, Elsevier
- UENO, Y. & HSIEH, D. P. H. (1985) *The Toxicology of Mycotoxins*. CRC Critical Reviews in Toxicology 14, 99-132
- ULRICH, S.-U. (2016) Charakterisierung ausgewählter Isolate von *Stachybotrys* spp. anhand kulturmorphologischer, molekularbiologischer und massenspektrometischer Verfahren. In Tierärztliche Fakultät, Veterinärwissenschaftliches Department. München, LMU München
- ULRICH, S., BIERMAIER, B., BADER, O., WOLF, G., STRAUBINGER, R. K., DIDIER, A., SPERNER, B., SCHWAIGER, K., GAREIS, M. & GOTTSCHALK, C. (2016) Identification of *Stachybotrys* spp. by MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry* 408, 7565-7581
- ULRICH, S., NIESSEN, L., EKRUTH, J., SCHÄFER, C., KALTNER, F. & GOTTSCHALK, C. (2019) Truncated satratoxin gene clusters in selected isolates of the atranone chemotype of *Stachybotrys chartarum* (Ehrenb.) S. Hughes. *Mycotoxin Research* 36, 83-91
- ULRICH, S. & SCHÄFER, C. (2020) Toxin Production by *Stachybotrys chartarum* Genotype S on Different Culture Media. *Journal of Fungi* 6, 159

- VAN REENEN-HOEKSTRA, E. S., SAMSON, R. A., VERHOEFF, J., VAN WIJNEN, H. & BRUNEKREEF, B. (1991) Detection and identification of moulds in dutch houses and non-industrial working environments. *Grana* 30, 418-423
- VESPER, S. J., DEARBORN, D. G., ELIDEMIR, O. & HAUGLAND, R. A. (2000) Quantification of siderophore and hemolysin from *Stachybotrys chartarum* strains, including a strain isolated from the lung of a child with pulmonary hemorrhage and hemosiderosis. *Appl Environ Microbiol* 66, 2678-2681
- VESPER, S. J., MAGNUSON, M. L., DEARBORN, D. G., YIKE, I. & HAUGLAND, R. A. (2001) Initial characterization of the hemolysin stachylysin from *Stachybotrys chartarum*. *Infect Immun* 69, 912-916
- VESPER, S. J. & VESPER, M. J. (2002) Stachylysin may be a cause of hemorrhaging in humans exposed to *Stachybotrys chartarum*. *Infect Immun* 70, 2065-2069
- WANG, A., XU, Y., GAO, Y., HUANG, Q., LUO, X., AN, H. & DONG, J. (2015a) Chemical and bioactive diversities of the genera *Stachybotrys* and *Memnoniella* secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews* 14, 623-655
- WANG, Y., HYDE, K. D., MCKENZIE, E. H. C., JIANG, Y.-L., LI, D.-W. & ZHAO, D.-G. (2015b) Overview of *Stachybotrys* (*Memnoniella*) and current species status. *Fungal Diversity* 71, 17-83
- WANNEMACHER, R. W. & WIENER, S. L. (1997) Trichothecene mycotoxins. In medical aspects of chemical and biological warfare. Hrsg. ZAJTCHUK, R., BELLAMY, R. F., SIDELL, R.R., TAKAFUJI, E.T., FRANZ, D.R. Office of The Surgeon General at TMM Publications, United States of America. 655-676
- WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S. & TAYLOR, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR Protocols: A guide to methods and applications. Hrsg. INNIS, M., GELFAND, D., SHINSKY, J., WHITE, T., Academic Press. 315-322
- WIGMANN, É. F., MEYER, K., CENDOYA, E., MAUL, R., VOGEL, R. F. & NIESSEN, L. (2020) A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) based assay for the rapid and sensitive group-specific detection of fumonisin producing *Fusarium* spp. *International Journal of Food Microbiology* 325, 108627
- YANG, B., HE, Y., LIN, S., ZHANG, J., LI, H., WANG, J., HU, Z. & ZHANG, Y. (2019) Antimicrobial dolabellanes and atranones from a marine-derived strain of the toxigenic fungus *Stachybotrys chartarum*. *J Nat Prod* 82, 1923-1929
- ZHANG, P., LI, Y., JIA, C., LANG, J., NIAZ, S.-I., LI, J., YUAN, J., YU, J., CHEN, S. & LIU, L. (2017) Antiviral and anti-inflammatory meroterpenoids: stachybonoids A–F from the crinoid-derived fungus *Stachybotrys chartarum* 952. *RSC Advances* 7, 49910-49916
- ZHAO, J., FENG, J., TAN, Z., LIU, J., ZHANG, M., CHEN, R., XIE, K., CHEN, D., LI, Y., CHEN, X. & DAI, J. (2018) Bistachybotrynsins A–C, three phenylspirodrimane dimers with cytotoxicity from *Stachybotrys chartarum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 28, 355-359

ZHAO, J., FENG, J., TAN, Z., LIU, J., ZHAO, J., CHEN, R., XIE, K., ZHANG, D., LI, Y. & YU, L. (2017a) Stachybotryins A–G, phenylspirodrimane derivatives from the fungus *Stachybotrys chartarum*. *J Nat Prod* 80, 1819-1826

ZHAO, J., LIU, J., SHEN, Y., TAN, Z., ZHANG, M., CHEN, R., ZHAO, J., ZHANG, D., YU, L. & DAI, J. (2017b) Stachybotryins A–E, prenylated isoindolinone derivatives with anti-HIV activity from the fungus *Stachybotrys chartarum*. *Phytochemistry Letters* 20, 289-294

## 8 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Aktuelle Systematik der Gattung <i>Stachybotrys</i> .....	11
<b>Abbildung 2:</b> <i>S. chartarum</i> auf MEA – Dreipunktkultur.....	14
<b>Abbildung 3:</b> Konidiophore mit Phialiden und einer einzelnen Konidie von <i>S. chartarum</i> .....	15
<b>Abbildung 4:</b> Darstellung der unterschiedlichen genetischen Ausstattung von <i>S. chartarum</i>	16
<b>Abbildung 5:</b> Guttationströpfchen auf einer Kultur von <i>S. chartarum</i> auf MEA.....	17
<b>Abbildung 6:</b> Chemische Kernstruktur für die Trichothecene A-D.....	19
<b>Abbildung 7:</b> Strukturformeln der makrozyklischen Trichothecene, die von <i>S. chartarum</i> Chemotyp S gebildet werden können .....	20
<b>Abbildung 8:</b> Strukturformeln der Atranone A – K.....	22
<b>Abbildung 9:</b> Phenylspirodriman Stachybotryamid.....	23
<b>Abbildung 10:</b> Schematische Darstellung einer LAMP-Reaktion.....	40

## 9 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Wachstum und Versporung von <i>Stachybotrys</i> auf verschiedenen Festnährmedien .....	13
<b>Tabelle 2:</b> Metabolitenprofil von <i>S. chartarum</i> und <i>S. chlorohalonata</i> .....	18
<b>Tabelle 3:</b> Vorkommen von <i>Stachybotrys</i> spp. in Lebensmittelmatrices .....	25
<b>Tabelle 4:</b> Beispiele für das Vorkommen von <i>S. chartarum</i> auf Innenraummaterialien .....	26
<b>Tabelle 5:</b> Krankheitsausbrüche bei Menschen im Zusammenhang mit <i>S. chartarum</i> .....	28
<b>Tabelle 6:</b> Formen und Symptome der Stachybotryotoxikose des Pferdes .....	30
<b>Tabelle 7:</b> Fälle von Stachybotryotoxikose bei diversen Tierarten .....	31
<b>Tabelle 8:</b> Zytotoxizitätswerte verschiedener Mykotoxine im MTT-Zellkulturtest an SK-Zellen .....	36

## 10 Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Univ.-Prof. Dr. Karin Schwaiger und Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Manfred Gareis für die ausgezeichnete Betreuung des interessanten Themas und die exzellente Unterstützung während Studium und Promotion. Ich bedanke mich auch für die tollen VetResearch Projekte, die ich am Lehrstuhl schon in meiner Studienzzeit bearbeiten durfte. Diese studentischen Forschungsprojekte haben mir den Weg zur Dissertation geebnet und die nötigen Fähigkeiten für die Arbeit im Labor sowie wissenschaftliches Denken verschafft.

Ausdrücklich bedanken möchte ich mich bei Herrn apl. Prof. Dr. rer. nat. Ludwig Niessen für die außerordentlich gute Unterstützung im Labor und für die Möglichkeit so unkompliziert die Einrichtungen in der technischen Mikrobiologie der TUM in Weihenstephan benutzen zu dürfen. Professor Niessen unterstütze mich hervorragend nicht nur bei der praktischen Tätigkeit im Labor und bei der Ergebnisauswertung, sondern auch beim Verfassen der wissenschaftlichen Arbeit und der Dissertation.

Meinem Betreuer Herrn Dr. rer. nat. Christoph Gottschalk möchte ich für die hervorragende Unterstützung bei Anfertigung der Dissertation, sowie bei meinen VetResearch Projekten danken.

Besonderer Dank gilt meinen Kollegen am Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit für die nette Zusammenarbeit und das gute Arbeitsklima. Danke an Herrn Dr. Florian Kaltner für die tolle Unterstützung in der Bioanalytik.

Tiefe Dankbarkeit gilt meiner Familie, besonders meinen Eltern Ingrid und Franz Köck, die mich großzügig während Studium und Promotion unterstützt haben. Vielen Dank an meine Schwester Stephanie Köck und meine Freundin Vera Riepl für ihre aufbauenden Ratschläge.